



**Mariana de Carvalho Ribeiro Coutinho**

Licenciada em Bioquímica

**Desenvolvimento de um teste de diagnóstico serológico  
rápido para a deteção de *Pneumocystis jirovecii* em  
amostras clínicas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia

**Orientadores:** Prof. Doutora Olga Matos, Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa

Prof. Doutor Ricardo Franco, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

**Co-Orientadores:** Doutora Inês Gomes, Instituto de Medicina Molecular da Universidade de Lisboa

Doutor Francisco Esteves, Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa

Investigador Fernando Cardoso, Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro Miguel Calado Simões

Arguente: Doutora Maria Manuela Jesus Guilherme Gaspar

Vogal: Prof. Doutor José Ricardo Ramos Franco



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setembro 2015**



**Mariana de Carvalho Ribeiro Coutinho**

Licenciada em Bioquímica

**Desenvolvimento de um teste de diagnóstico serológico  
rápido para a deteção de *Pneumocystis jirovecii* em  
amostras clínicas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia

**Orientadores:** Prof. Doutora Olga Matos, Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa

Prof. Doutor Ricardo Franco, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

**Co-Orientadores:** Doutora Inês Gomes, Instituto de Medicina Molecular da Universidade de Lisboa

Doutor Francisco Esteves, Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa

Investigador Fernando Cardoso, Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro Miguel Calado Simões

Arguente: Doutora Maria Manuela Jesus Guilherme Gaspar

Vogal: Prof. Doutor José Ricardo Ramos Franco

**Setembro 2015**



# Desenvolvimento de um teste de diagnóstico serológico rápido para a deteção de *Pneumocystis jirovecii* em amostras clínicas

Este *Copyright*© pertence a Mariana de Carvalho Ribeiro Coutinho e à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

**Página em Branco**

# AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Olga Matos agradeço a possibilidade de realização deste projeto e a sua constante preocupação para o sucesso do mesmo.

Ao Professor Doutor Ricardo Fraco agradeço pela orientação e pela possibilidade de realização deste projeto.

Ao Doutor Francisco Esteves pelo empenho e esforço depositados neste projeto.

À Doutora Inês Gomes pela confiança, dedicação e por todo o tempo que dispensou para que este projeto fosse possível.

Ao Investigador Fernando Cardoso agradeço pela sua orientação, conhecimentos transmitidos e pela confiança em mim depositada.

À Ana Inês Reis, Jorge Figueiredo, Maria João Oliveira, Marta Ribeiro, Raquel Martins e Roberto Baptista pelos momentos de descontração, entreaajuda e pelo incentivo constante.

Aos meus pais pelo apoio e amor incondicional, o meu muito obrigado.

**Página em Branco**



# RESUMO

*Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*) é um fungo atípico que exhibe tropismo para os pulmões, com especificidade restrita para o homem, que causa pneumonia por *Pneumocystis* (PPc) em doentes imunocomprometidos. O diagnóstico da PPc baseia-se em técnicas de coloração citoquímica, imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais e reação em cadeia de polimerase, com recurso a amostras respiratórias obtidas por métodos invasivos. Por este motivo, surge a necessidade de desenvolver um teste de diagnóstico rápido (TDR) para infeção por *P. jirovecii*, com recurso a métodos menos onerosos e a amostras biológicas obtidas de forma menos invasiva, como o sangue.

Devido às propriedades óticas notáveis das nanopartículas de ouro (AuNP), o presente estudo teve por objectivo conjugar AuNP esféricas com o antígeno recombinante sintético multiepítopo (antígeno rsm), específico de *P. jirovecii*, para a formação de bionanoconjugados AuNP-Antígeno, com vista ao desenvolvimento do TDR.

Com o intuito de obter maior quantidade de antígeno, foi necessário isolar o vetor de expressão pLATE31, que continha a sequência codificante para o antígeno rsm, expresso em *E. coli* BL21 Star (DE3) e clonar em *E. coli* XJb (DE3). Por cromatografia de afinidade de íão metálico obtiveram-se melhores resultados na purificação com o íão cobre comparativamente aos íões zinco, cobalto e níquel.

Por eletroforese em gel de agarose a 0,3% verificou-se que o ligando MUA permitiu formar bionanoconjugados mais estáveis e robustos, sendo que para a razão molar [Antígeno]/[AuNP-MUA] 1:500 foi possível garantir a existência de uma camada de antígeno a revestir a superfície das AuNP. Este resultado foi igualmente comprovado pela variação da força iónica e do pH do meio envolvente, uma vez que os bionanoconjugados apresentaram um comportamento distinto das AuNP funcionalizadas com diferentes ligandos.

Com esta abordagem foi possível formar bionanoconjugados AuNP-MUA-Antígeno estáveis e robustos que no futuro permitirão detetar anticorpos anti-*P. jirovecii* e consequentemente desenvolver o TDR da PPc.

Palavras-chave: Antígeno recombinante sintético multiepítopo; Bionanoconjugados; Nanopartículas de ouro; *Pneumocystis jirovecii*; Pneumonia por *Pneumocystis*.

**Página em Branco**

# ABSTRACT

*Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*) is an atypical fungus which exhibits tropism for the lung, with restricted specificity to human, which causes *Pneumocystis pneumonia* (PPc) in immunocompromised patients. The diagnosis of PPc is based on cytochemical staining techniques, immunofluorescent staining with monoclonal antibodies and polymerase chain reaction, in pulmonary specimens obtained by invasive methods. For this reason, there is a need to develop a rapid diagnostic test (RDT) to detect *P. jirovecii* infection, using less expensive and invasive methods, such as blood.

Due to the remarkable optical properties of gold nanoparticles (AuNP), this study aimed to conjugate spherical gold nanoparticles with multiepitope synthetic recombinant antigen (msr antigen), specific to *P. jirovecii*, in the interest of obtaining bionanoconjugates AuNP-Antigen, for the development of RDT.

In order to obtain large amount of antigen, it was isolated the expression vector pLATE31, which contained the coding sequence for the msr antigen, expressed in *E. coli BL21 Star (DE3)* and cloning in *E. coli XJb (DE3)*. By immobilized metal affinity chromatography it was found an improvement on the purification with ion copper instead of ions zinc, cobalt and nickel.

Using 0.3% agarose gel electrophoresis it was found that the ligand MUA allows to form more stable and robust bionanoconjugates. Moreover for the 1:500 [Antigen]/[AuNP-MUA] molar ratio it was possible to ensure the existence of an antigen corona on the surface of AuNP. This result was also confirmed by changing ionic strength and pH of the surrounding medium, since bionanoconjugates present a different behavior from AUNP functionalized with different ligands.

In brief, using this approach allowed us to form stable and robust AuNP-MUA-Antigen bionanoconjugates that in future will be used to detect anti-*P. jirovecii* antibody and consequently develop PPc RDT.

Keywords: Bionanoconjugates; Gold nanoparticles; Multiepitope synthetic recombinant antigen *Pneumocystis jirovecii*; *Pneumocystis pneumonia*.

**Página em Branco**

# ÍNDICE

Agradecimentos .....	vii
Resumo .....	ix
Abstract .....	xi
Lista de figuras.....	xvii
Lista de quadros .....	xxi
Lista de abreviaturas .....	xxiii
Lista de símbolos .....	xxv
1 Introdução .....	1
1.1 Pneumocystis jirovecii .....	1
1.1.1 Referência histórica e Classificação taxonómica.....	1
1.1.2 Morfologia e Ciclo de vida de Pneumocystis jirovecii .....	2
1.1.3 Transmissão de Pneumocystis jirovecii .....	3
1.1.4 Epidemiologia da infeção por Pneumocystis jirovecii .....	4
1.1.5 Glicoproteína major superfície.....	4
1.1.6 Diagnóstico .....	5
1.1.7 Profilaxia e tratamento da pneumonia por Pneumocystis jirovecii .....	8
1.2 Nanotecnologia e Nanopartículas de Ouro .....	9
1.2.1 Nanopartículas de ouro .....	9
1.2.2 Funcionalização das nanopartículas de ouro .....	12
1.2.3 Bionanoconjugados .....	13
1.2.4 Ensaios de fluxo lateral.....	14
1.3 Técnicas gerais.....	17
1.3.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay .....	17
1.3.2 Eletroforese em gel de agarose.....	18
1.4 Objectivo do estudo .....	19
2 Material e Métodos.....	21
2.1 Confirmação da presença da sequência codificante para o antígeno em pLATE31, presente em <i>E. coli</i> BL21 Star (DE3) .....	21
2.2 Expressão e produção do antígeno em <i>E. coli</i> BL21 Star (DE3).....	23
2.3 Clonagem do vetor pLATE31 em <i>E. coli</i> XJb (DE3).....	24

2.3.1	Isolamento do DNA plasmídico .....	25
2.3.2	Obtenção de células competentes.....	25
2.3.3	Transformação de <i>E. coli</i> XJb (DE3) com o vetor de expressão pLATE31.....	26
2.3.4	Confirmação da presença do antígeno em <i>E. coli</i> XJb (DE3) .....	27
2.4	Expressão, produção e purificação do antígeno em <i>E. coli</i> XJb (DE3) .....	27
2.5	Otimização da expressão, produção e purificação do antígeno .....	29
2.6	Síntese de nanopartículas de ouro.....	32
2.6.1	Caracterização das nanopartículas de ouro .....	33
2.7	Funcionalização de nanopartículas de ouro.....	34
2.7.1	AuNP-MUA .....	34
2.7.2	AuNP-CALNN .....	34
2.8	Formação de bionanoconjugados .....	34
2.8.1	AuNP-MUA-Antígeno.....	34
2.8.2	AuNP-MUA-EDC/NHS-Antígeno .....	35
2.8.3	AuNP-CALNN-Antígeno.....	35
2.9	Estabilidade coloidal das nanopartículas de ouro e dos bionanoconjugados .....	35
2.9.1	Variação da força iônica .....	36
2.9.2	Variação do pH do meio .....	36
2.10	Técnicas gerais.....	36
2.10.1	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay .....	36
2.10.2	Eletroforese em gel de agarose a 0,3% .....	37
2.10.3	Eletroforese em gel de SDS-PAGE .....	38
2.10.4	Método do Ácido Bicinconínico.....	38
3	Resultados e Discussão .....	41
3.1	Confirmação da presença da sequência codificante para o antígeno em pLATE31, presente em <i>E. coli</i> BL21 Star (DE3) .....	41
3.2	Expressão e produção do antígeno em <i>E. coli</i> BL21 Star (DE3).....	42
3.3	Clonagem do vetor pLATE31 em <i>E. coli</i> XJb (DE3).....	43
3.4	Expressão, produção e purificação do antígeno em <i>E. coli</i> XJb (DE3) .....	47
3.5	Otimização da expressão, produção e purificação do antígeno em <i>E. coli</i> XJb (DE3) .....	50
3.6	Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro.....	71
3.7	Funcionalização das nanopartículas de ouro .....	72

3.8	Formação dos bionanoconjugados AuNP-Antigénio.....	74
3.8.1	AuNP-MUA-Antigénio.....	75
3.8.2	AuNP-MUA-EDC/NHS-Antigénio .....	77
3.8.3	AuNP-CALNN-Antigénio.....	79
3.9	Estabilidade coloidal das nanopartículas de ouro e dos bionanoconjugados .....	80
3.9.1	Variação da força iónica .....	80
3.9.2	Variação do pH do meio .....	82
4	Conclusão .....	85
4.1	Síntese do trabalho .....	85
4.2	Perspetivas futuras.....	86
5	Referências bibliográficas.....	89
	Anexos .....	97
	Anexo 1 - Vetor de expressão pLATE31 .....	97
	Anexo 2 - Isolamento de DNA plasmídico pelo kit illustra plasmidPrep Mini Spin Kit.....	99
	Anexo 3 - Ensaio realizados para otimizar a purificação do antigénio .....	100
	Anexo 4 - Eletroforese em gel de SDS-PAGE.....	106
	Anexo 5 - Método do Ácido Bicínconínico .....	108

**Página em Branco**



# LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Representação esquemática do ciclo de vida de <i>Pneumocystis</i> . (I) Infecção pulmonar. (II) Reprodução assexuada. (III) Reprodução sexuado. Adaptado de <sup>10</sup> . ....	3
<b>Figura 1.2</b> Quistos de <i>P. jirovecii</i> corados por duas técnicas para o diagnóstico definitivo da PPC em amostras respiratórias. a) Formas quísticas coradas pela técnica de metenamina prata e observadas por microscopia ótica (x1000); b) Formas quísticas coradas pela técnica de imunofluorescência com anticorpos monoclonais e observados por microscopia de fluorescência (x1000). Retirado de <sup>2</sup> . ....	7
<b>Figura 1.3</b> Representação esquemática do efeito de LSPR. Indução de um dipolo que oscila em fase com o campo elétrico da luz incidente. Adaptado de <sup>25</sup> . ....	10
<b>Figura 1.4</b> Agregação das AuNP pela variação da força iônica do meio envolvente. Nos espectros de UV-vis observam-se as curvas características para as AuNP monodispersas e agregadas. a) Solução de nanopartículas de ouro monodispersas apresenta cor velha; b) Solução de AuNP agregadas exibe cor azul-arroxeadas. Adaptado de <sup>27</sup> . ....	11
<b>Figura 1.5</b> Estrutura do ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA). Retirado de <sup>37</sup> . ....	12
<b>Figura 1.6</b> Estrutura do pentapéptido CALNN. Retirado de <sup>39</sup> . ....	13
<b>Figura 1.7</b> Esquema do TDR para detetar anticorpos anti- <i>P. jirovecii</i> . a) Resultado para um teste positivo; b) Resultado para um teste negativo. Adaptado de <sup>49</sup> . ....	16
<b>Figura 1.8</b> Diferentes formatos de ELISA: direto, indireto e de <i>sandwich</i> . Adaptado de <sup>53</sup> . ....	18
<b>Figura 2.1</b> Fluxograma da metodologia aplicada correspondente à expressão, produção e purificação do antígeno, assim como à formação e estudo da estabilidade dos bionanoconjugados. ....	21
<b>Figura 2.2</b> Representação esquemática da expressão e produção do antígeno, desde o crescimento até à lise celular. ....	30
<b>Figura 2.3</b> a) A solução de Au(III) de cor amarela b) torna-se incolor após adição de citrato de sódio. Segundos depois, c) a solução adquire cor azul/preta e por fim d) cor vermelha, indicativa de uma solução coloidal de nanopartículas de ouro esféricas. ....	33
<b>Figura 2.4</b> Representação esquemática da técnica de ELISA para a deteção de antígeno. O anticorpo anti- <i>P. jirovecii</i> liga-se especificamente ao antígeno imobilizado. Um anticorpo secundário, conjugado	

com uma enzima, liga-se ao anticorpo primário. Na presença do substrato produz-se um sinal visível que permite inferir a presença do antígeno. Adaptado de <sup>71</sup> . .....	37
<b>Figura 3.1</b> Gel de agarose a 1% para as 10 colónias isoladas (1 a 10). Representação do marcador de peso molecular 100 pb (M), do controlo negativo (-) e controlo positivo (+).....	41
<b>Figura 3.2</b> Gel de SDS-PAGE a 15% após a lise celular de <i>E. coli</i> BL21 Star (DE3). M - Marcador de pesos moleculares; 1 - Sedimento; 2 - Sobrenadante.....	42
<b>Figura 3.3</b> Gel de agarose a 1% para o DNA plasmídico isolado. M - Marcador de peso molecular; A - DNA plasmídico A; B - DNA plasmídico B. ....	44
<b>Figura 3.4</b> Número de UFC em função dos diferentes tempos de incubação (1, 2 e 4 min) para o choque térmico a 42°C.....	45
<b>Figura 3.5</b> Gel de SDS-PAGE a 15%. M - Marcador de pesos moleculares; 1 - <i>E. coli</i> com o vetor de expressão mas sem indução por IPTG; 2 - <i>E. coli</i> com o vetor de expressão e com indução por IPTG; 3 - <i>E. coli</i> sem o vetor de expressão e com indução por IPTG.....	46
<b>Figura 3.6</b> Gel de SDS-PAGE a 15% após a lise celular de <i>E. coli</i> XJb (DE3). M - Marcador de pesos moleculares; 1 - Sobrenadante; 2 - Sedimento.....	48
<b>Figura 3.7</b> Ensaio de ELISA resultante da purificação do antígeno rsm por IMAC.....	49
<b>Figura 3.8</b> Gel de SDS-PAGE a 15% após concentrar o antígeno com acetona. M - Marcador de pesos moleculares; 1 - Sobrenadante; 2 - Sedimento.....	50
<b>Figura 3.9</b> a) e b) Gel de SDS-PAGE a 15% após a lise celular de <i>E. coli</i> XJb (DE3). M - Marcador de pesos moleculares; 1 - Sobrenadante; 2 - Sedimento.....	51
<b>Figura 3.10</b> Ensaio de ELISA decorrente da purificação do antígeno rsm por IMAC. ....	52
<b>Figura 3.11</b> Gel de SDS-PAGE a 15% após concentrar o antígeno com PEG 8000. M- Marcador de pesos moleculares; 1 - Sedimento; 2 - Sobrenadante.....	53
<b>Figura 3.12</b> Ensaio de ELISA resultante da purificação do antígeno rsm por IMAC.....	54
<b>Figura 3.13</b> Gel de SDS-PAGE a 15% após a purificação do antígeno por um gradiente de 100, 200 e 500 mM de imidazole. M - Marcador de pesos moleculares; 1 - Sobrenadante; 2 - Sedimento; 3 - Sobrenadante; 4 - Sedimento; 5 - Sobrenadante; 6 - Sedimento. ....	55
<b>Figura 3.14</b> Ensaio de ELISA após a purificação do antígeno rsm por IMAC.....	56

<b>Figura 3.15</b> Gel de SDS-PAGE a 15%. M - Marcador de pesos moleculares; 1 - Sedimento; 2 - Sobrenadante. ....	57
<b>Figura 3.16</b> Ensaio de ELISA resultante da purificação do antígeno rsm por IMAC. ....	58
<b>Figura 3.17</b> Gel de SDS-PAGE a 15%. M - Marcador de pesos moleculares; 1 - Antígeno rsm. ....	59
<b>Figura 3.18</b> Ensaio de ELISA resultante da purificação do antígeno rsm por IMAC. ....	59
<b>Figura 3.19</b> Ensaio de ELISA resultante da purificação do antígeno por IMAC com quatro iões metálicos diferentes. ....	61
<b>Figura 3.20</b> Gel de SDS-PAGE a 15%. M - Marcador de pesos moleculares; 1 - lã cobre; 2 - lã zinco; 3 - lã cobalto; 4 - lã níquel. ....	62
<b>Figura 3.21</b> Ensaio de ELISA resultante da purificação do antígeno rsm por IMAC. ....	63
<b>Figura 3.22</b> Gel de SDS-PAGE a 15%. M - Marcador de pesos moleculares; 1 - Solução de imidazole a 100 mM; 2 - Solução de imidazole a 200 mM; 3 - Solução de imidazole a 500 mM. ....	63
<b>Figura 3.23</b> Ensaio de ELISA referente à purificação do antígeno rsm por IMAC. ....	64
<b>Figura 3.24</b> Gel de SDS-PAGE a 15%. 1 - Frações 20 a 27; 2 - Frações 18 e 19. ....	65
<b>Figura 3.25</b> Ensaio de ELISA resultante da purificação do antígeno rsm por IEC. ....	66
<b>Figura 3.26</b> Gel de SDS-PAGE a 15%. M - Marcador de pesos moleculares; 1 - Antígeno rsm. ....	66
<b>Figura 3.27</b> Fluxograma da metodologia a aplicar para purificar o antígeno rsm. ....	67
<b>Figura 3.28</b> Ensaio de ELISA proveniente da purificação do antígeno rsm por IMAC. ....	68
<b>Figura 3.29</b> Gel de SDS-PAGE a 15%. M - Marcador de pesos moleculares; a) 1 - Amostra A: frações 18 e 19; 2 - Amostra A: frações 20 a 28; 3 - Amostra B: frações 18 a 21; 4 - Amostra B: frações 22 a 28; 5 - Amostra C: frações 18 a 20; 6 - Amostra C: frações 21 a 28; 7 - Amostra D: frações 18 e 19; 8 - Amostra D: frações 20 a 28; b) 9 - Amostra E: frações 18 a 20; 10 - Amostra E: frações 21 a 28; 11 - Amostra F: frações 18 e 19; 12 - Amostra F: frações 20 a 28; 13 - Amostra G: frações 18 e 19; 14 - Amostra G: frações 20 a 28. ....	70
<b>Figura 3.30</b> Espectro de UV-vis de AuNP com 15 nm de tamanho médio, sintetizadas pelo método de <i>Turkevich</i> . A concentração de AuNP nesta solução é de 8,90 nM, com absorvância máxima da LSPR a 521 nm. ....	71
<b>Figura 3.31</b> Espectro de UV-vis de 1 nM AuNP-Citrato e 1 nM AuNP-MUA. ....	73

<b>Figura 3.32</b> Espectro de UV-vis de 1 nM AuNP-Citrato e 1 nM AuNP-CALNN .....	73
<b>Figura 3.33</b> Eletroforese em gel de agarose a 0,3% para AuNP-MUA a 5,19 nM com razões molares de antígeno de 0 a 1200, por ordem crescente. Representação da polaridade dos eletrodos – (ânodo) e + (cátodo). .....	75
<b>Figura 3.34</b> Mobilidade eletroforética ( $\mu$ ) para os bionanoconjugados AuNP-MUA-Antígeno calculada a partir das distâncias de migração pelo gel de eletroforese a 0,3%. .....	76
<b>Figura 3.35</b> Espectro de UV-vis para 1 nM AuNP-MUA e 1 nM AuNP-MUA-Antígeno (1:500). Deslocamento do máximo da banda de LSPR para comprimentos de onda maiores para a conjugação das AuNP-MUA com o antígeno. ....	77
<b>Figura 3.36</b> Eletroforese em gel de agarose a 0,3% para AuNP-MUA-EDC/NHS a 5,19 nM com razões molares de antígeno de 0 a 1300, por ordem crescente. Representação da polaridade dos eletrodos – (ânodo) e + (cátodo). .....	78
<b>Figura 3.37</b> Mobilidade eletroforética ( $\mu$ ) para os bionanoconjugados AuNP-MUA-EDC/NHS-Antígeno calculada a partir das distâncias de migração pelo gel de eletroforese a 0,3%. .....	79
<b>Figura 3.38</b> Razão de agregação das AuNP-Citrato, AuNP-CALNN, AuNP-MUA e dos bionanoconjugados em função da concentração de NaCl. ....	81
<b>Figura 3.39</b> Razão de agregação das AuNP-Citrato, AuNP-CALNN, AuNP-MUA e dos bionanoconjugados em função da concentração de NaCl. ....	83

# LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.1</b> Parâmetros físico-químicos do antígeno rsm. Segundo <sup>16</sup> .....	5
<b>Quadro 2.1</b> Composição da mistura de PCR para confirmação da presença da sequência do antígeno rsm em <i>E. coli</i> BL21 Star (DE3). .....	22
<b>Quadro 2.2</b> Condições aplicadas na PCR para confirmação da sequência do antígeno rsm em <i>E. coli</i> BL21 Star (DE3). .....	23
<b>Quadro 2.3</b> Resumo das diferentes técnicas utilizadas para purificar e concentrar o antígeno rsm..	31
<b>Quadro 3.1</b> Concentração (ng/μL) do DNA plasmídico A e DNA plasmídico B. ....	44
<b>Quadro 3.2</b> Falcons correspondentes às frações mais concentradas e mais diluídas para as amostras numeradas de A a G. ....	69
<b>Quadro 3.3</b> Concentração de antígeno pelo método de BCA para as frações 18 e 19 correspondentes à amostra A. ....	70
<b>Quadro 3.4</b> Máximo da banda de LSPR (nm) para nanopartículas funcionalizadas com diferentes ligandos. ....	74
<b>Quadro 3.5</b> Máximo da banda de LSPR (nm) para AuNP-MUA e AuNP-MUA-Antígeno (1:500). .....	77
<b>Quadro 3.6</b> Concentrações de NaCl às quais foram atingidos os pontos de meia agregação e de agregação para as AuNP com diferentes ligandos e para os bionanoconjugados. ....	82
<b>Quadro 3.7</b> Valores de pH aos quais foram atingidos os pontos de meia agregação e de agregação para as AuNP com diferentes ligandos e para os bionanoconjugados. ....	84

**Página em Branco**

# LISTA DE ABREVIATURAS

Abs – Absorvância

Antigénio rsm – Antigénio recombinante sintético multiepítopo

AuNP – Nanopartículas de ouro

BCA – Método do ácido bincinconínico (do inglês *Bicinconinic Acid Assay*)

BSA – Albumina de soro bovino (do inglês *Bovine Serum Albumin*)

Co<sup>2+</sup> - Ião cobalto

-COOH – grupo carboxilo

Cu<sup>2+</sup> - Ião cobre

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic Acid*)

dNTPs – Desoxirribonucleotidos fosfatados (do inglês *Deoxyribonucleotide Triphosphate*)

*E. coli* – *Escherichia coli*

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

*Fw* – *Forward*

GRAVY – do inglês *GRand AVerage of hydrophaticity*

IB – Corpos de inclusão (do inglês *Inclusion Bodies*)

IEC - Cromatografia de troca iónica (do inglês *Ion Exchange Chromatography*)

IgM – Imunoglobulina M

IMAC – Cromatografia de afinidade com metal imobilizado (do inglês *Immobilized Metal Affinity Chromatography*)

KL-6 – Antigénio *Krebs von den Lungen-6*

LBA – Lavado brocoalveolar

LDH – Lactato desidrogenase

LFA – Ensaio de fluxo lateral (do inglês *Lateral Flow Assay*)

LPS – Lipopolissacarídeos (do inglês *Lipopolysaccharide*)

LSPR – Ressonância plasmónica de superfície localizada (do inglês *Localized Surface Plasmon Resonance*)

Msg – Glicoproteína *major* de superfície (do inglês *Major surface glycoprotein*)

MWCO – *Molecular weight cut off*

Ni<sup>2+</sup> - Ião níquel

Nº - Número

NTA – ácido nitrilotriacético (do inglês *Nitrilotriacetic Acid*)

*P. carinii* – *Pneumocystis carinii*

PaO<sub>2</sub> – Pressão parcial do oxigénio no sangue periférico

PCR – Reação em cadeia de polimerase (do inglês *Polimerase Chain Reaction*)

pI – Ponto isoelétrico

PPc – Pneumonia por *Pneumocystis*

RNA – Ácido ribonucleico (do inglês *Ribonucleic Acid*)

*Rv* – *Reverse*

SAM – S-adenosilmetionina

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

-SH – grupo tiol

sida – Síndrome da imunodeficiência humana adquirida

T CD4<sup>+</sup> - Linfócitos T com recetores do agrupamento de diferenciação 4 (do inglês *cluster of differentiation*)

TARV – Terapia anti retroviral

TDR – Teste de diagnóstico rápido

TMP-SMZ – Trimetopim-sulfametoxazol

UFC – Unidades formadoras de colónias

UV-vis – Ultravioleta-visível

VIH – Vírus da imunodeficiência humana

Zn<sup>2+</sup> - Ião zinco



# LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu$  - Mobilidade eletroforética

$\mu\text{g}$  – Micrograma

$\mu\text{L}$  – Microlitro

$\mu\text{m}$  – Micrómetro

$\mu\text{M}$  – Micromolar

$\epsilon$  – Coeficiente de extinção molar

$^{\circ}\text{C}$  – Graus *Celsius*

$\text{cm}$  – Centímetro

$\text{g}$  – Grama

$\text{h}$  – Horas

$\text{kDa}$  – Kilodaltons

$\text{M}$  – Molar

$\text{mg}$  – Miligrama

$\text{min}$  – Minutos

$\text{mL}$  – Mililitro

$\text{mM}$  – Milimolar

$\text{mm}^3$  – Milímetro cúbico

$\text{mmHg}$  – Mililitro de mercúrio

$\text{ng}$  – Nanograma

$\text{nm}$  – Nanómetro

$\text{nM}$  – Nanomolar

*O.N.* – *Over Night*

$\text{p/v}$  – Peso/volume

$\text{pb}$  – Pares de bases

$\text{pH}$  – Potencial de hidrogénio

$\text{rpm}$  – Rotações por minuto

$\text{s}$  – Segundo

$\text{V}$  – Volts

$\text{v/v}$  – Volume/volume

**Página em Branco**

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Pneumocystis jirovecii*

### 1.1.1 *Referência histórica e Classificação taxonómica*

O género *Pneumocystis* foi descrito pela primeira vez por Carlos Chagas, em 1909, ao observar uma forma morfológica, nunca antes identificada, em tecido pulmonar de porquinhos-da-índia utilizados como modelo experimental, para o estudo da tripanossomose humana americana também designada de doença de Chagas. Desta forma, Carlos Chagas pensou ter identificado uma nova forma do ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*<sup>1,2</sup>.

Em 1910, Antonio Carini observou estruturas similares em tecido de pulmão de ratos infetados por *Trypanosoma lewisi* e suspeitou que poderia ser uma nova espécie de tripanossoma. Delanoe e Delanoe, em 1912, num estudo detalhado do material biológico resultante das amostras de Carini, observou quistos no tecido pulmonar de ratos sem infeção por *Trypanosoma*. Por este motivo, este casal concluiu que se tratava de um organismo distinto de *Trypanosoma* e desde logo atribuíram-lhe a designação de *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*). Esta denominação está relacionada com o tropismo que a espécie tem para o pulmão “*Pneumocystis*”, e “*carinii*” em honra a Antonio Carini que havia possibilitado tal investigação<sup>1,2</sup>

Antes de 1980, a pneumonia por *Pneumocystis* (PPc) também designada por pneumocistose, era reconhecida como uma infeção rara mas fatal, principalmente em doentes com leucemia grave ou outras doenças hematológicas malignas. Na década de 1980, com a epidemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (sida) a prevalência da PPc aumentou drasticamente em doentes seropositivos para o vírus da imunodeficiência humana (VIH). Este microrganismo tornou-se uma ameaça emergente para doentes imunocomprometidos<sup>3</sup>.

*P. carinii* foi inicialmente classificado com um protozoário tendo em conta os critérios histológicos das suas formas do ciclo de vida e a resposta ao tratamento com o fármaco antiprotozoário pentamidina. Em 1988, *P. carinii* foi filogeneticamente reclassificado no reino fungi após a sequenciação da subunidade pequena do RNA ribossomal, uma vez que verificaram que *P. carinii* apresenta homologia com o fungo ascomiceto<sup>4,5</sup>. Contudo, *Pneumocystis* é um fungo “atípico”, como não contém ergosterol (constituente da membrana celular dos fungos) é suscetível a fármacos antiparasitários, como a pentamidina ou a primaquina, mas não é suscetível à ação da maioria dos antifúngicos, como por exemplo a anfotericina B<sup>2,6</sup>. O recurso a técnicas moleculares revelou a

existência de espécies do género *Pneumocystis* em diversos mamíferos, indicativo de que a espécie é específica para o hospedeiro<sup>3,7</sup>.

Em 1999, a comunidade científica alterou a designação da espécie isolada dos humanos para *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*), em homenagem a Otto Jirovec que identificou pela primeira vez diferenças entre as espécies que infetam os humanos e as espécies que infetam outros animais<sup>8</sup>.

Atualmente, a classificação taxonómica de *Pneumocystis jirovecii* é a seguinte<sup>9</sup>:

**Super reino:** Eukaryota

**Reino:** Fungi;

**Sub-reino:** Dikarya;

**Filo:** Ascomycota;

**Sub-filo:** Taphrinomycotina;

**Classe:** Pneumocystidomycetes;

**Ordem:** Pneumocystidales;

**Família:** Pneumocystidaceae;

**Género:** *Pneumocystis*;

**Espécie:** *Pneumocystis jirovecii*.

### 1.1.2 Morfologia e Ciclo de vida de *Pneumocystis jirovecii*

Devido à incapacidade de cultivo de *P. jirovecii* *in vitro*, o estudo do seu ciclo de vida é baseado em análises de microscopia eletrónica e de luz das formas observadas no tecido pulmonar infetado ou em culturas de curto período. Existem duas formas predominantes do ciclo de vida do microrganismo, o trofozoíto e o quisto<sup>4</sup>.

Os trofozoítos, ou formas tróficas, apresentam cerca de 1 a 4 µm de diâmetro, estrutura polimórfica e durante a infeção são a forma mais representativa relativamente ao quisto, aproximadamente de 10:1. Esta forma é facilmente identificada no tecido pulmonar devido à sua forma irregular e à associação com as células alveolares ou pneumócitos tipo I<sup>4,7</sup>. Os quistos são fáceis de identificar devido à sua morfologia típica. Apresentam forma esférica, de diâmetro entre 8 a 10 µm e contém oito corpos intraquísticos ou ascósporos que apresentam forma esférica a oval<sup>4,7</sup>.

*P. jirovecii* existe quase exclusivamente dentro dos alvéolos pulmonares do hospedeiro, onde a fixação do microrganismo ao epitélio alveolar promove fortemente a sua proliferação<sup>5</sup>. No decorrer da infeção, o trofozoíto (haploide) pode dividir-se por divisão binária (reprodução assexuada). Porém,

põe-se a hipótese de dois trofozoítos haploides se conjugarem formando o pré-quisto (diploide) dando, assim, origem à fase de reprodução sexuada. Nesta fase, ocorre a meiose seguida da mitose que origina um quisto com oito núcleos, os quais posteriormente são delimitados pela membrana citoplasmática dando origem a oito corpos intraquísticos. Com a maturação do quisto, os oito corpos intraquísticos são libertados e podem reproduzir-se de forma assexuada ou sexuada (**Figura 1.1**)<sup>4,10</sup>.

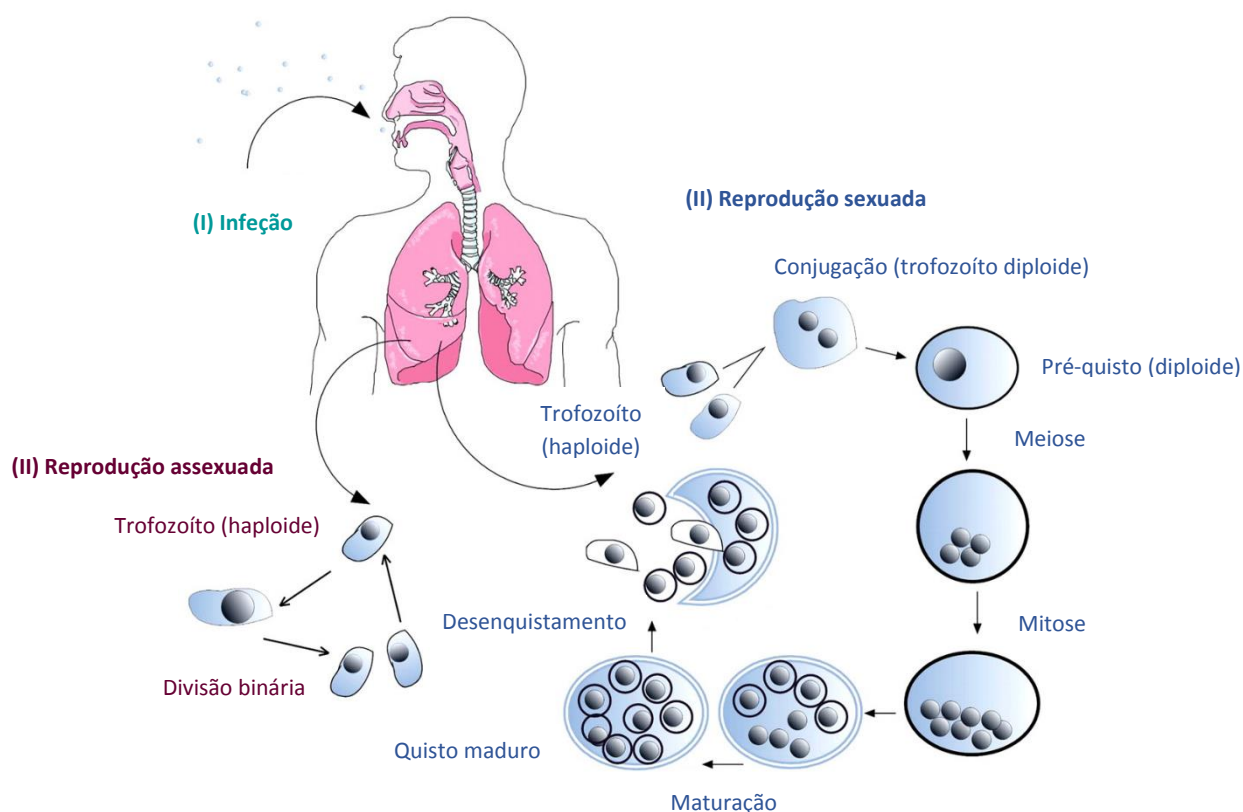


Figura 1.1 Representação esquemática do ciclo de vida de *Pneumocystis*. (I) Infecção pulmonar. (II) Reprodução assexuada. (III) Reprodução sexuada. Adaptado de<sup>10</sup>.

### 1.1.3 Transmissão de *Pneumocystis jirovecii*

Ainda não está totalmente compreendida qual a forma infetante responsável pela infeção, nem a via de transmissão de *P. jirovecii*. As espécies de *Pneumocystis* são específicas para o hospedeiro, por este motivo é possível excluir a transmissão de *P. jirovecii* ao homem através de uma fonte animal. Também não foi encontrado nenhuma fonte ambiental<sup>11</sup>. Ensaio realizados em animais indicam que a transmissão ocorre por via aérea, uma vez que a exposição de animais colonizados com *Pneumocystis* originou a colonização de animais saudáveis e o desenvolvimento da doença em animais imunocomprometidos<sup>4</sup>. Ensaio realizados em doentes imunocomprometidos, confirmaram a transmissão de DNA de *Pneumocystis* de doentes com PPC para os profissionais de saúde que os

tratavam<sup>11</sup>, o que favorece a hipótese de que a transmissão ocorre por via aérea, pelo contacto direto de pessoa para pessoa<sup>4</sup>.

#### 1.1.4 Epidemiologia da infeção por *Pneumocystis jirovecii*

*P. jirovecii* foi primeiramente identificado em crianças prematuras e mal-nutridas com pneumonia intersticial de células plasmáticas em países europeus durante a II Guerra Mundial, onde ocasionalmente ocorriam epidemias<sup>12</sup>. Nos anos 80 do século passado, a pneumonia por *Pneumocystis* foi a principal causa de morbilidade e de mortalidade em doentes seropositivos para VIH durante a epidemia VIH/sida<sup>13</sup>. Durante a fase inicial da epidemia, havia cerca de 20000 casos da PPc por ano<sup>6</sup>. No final dos anos 80 e início dos anos 90, a implementação da terapêutica anti retroviral (TARV) para o VIH e da quimioprofilaxia contra *Pneumocystis* permitiu reduzir a frequência da PPc.

No início do século XXI, a incidência da PPc diminuiu entre os doentes seropositivos para VIH nos países desenvolvidos, ocorrendo atualmente predominantemente em doentes que desconhecem a infeção por VIH, bem como em doentes sem acesso à TARV<sup>12</sup>. Enquanto nos países em desenvolvimento a prevalência da PPc em doentes com sida permanece alta e difícil de controlar. Pensava-se que a taxa de incidência da PPc nos países em desenvolvimento seria mais baixa, no entanto, o que se tem verificado nos últimos anos é que o número reduzido de casos reportados se deve por exemplo a dificuldades no diagnóstico da PPc<sup>1</sup>.

Atualmente, a PPc continua a ser uma infeção oportunista importante em doentes seropositivos para VIH mas também em doentes imunocomprometidos seronegativos para VIH, nomeadamente em doentes que recebem agentes imunossupressores devido a condições oncológicas, transplante de órgãos ou doenças autoimunes<sup>5</sup>.

#### 1.1.5 Glicoproteína major superfície

As glicoproteínas major de superfície (Msg, do inglês *Major surface glycoprotein*) são proteínas antigénicas de superfície de *Pneumocystis*, encontradas nos trofozoítos. Estas proteínas antigénicas, com o peso molecular de 120 kDa, ajudam na fixação de *Pneumocystis* às células epiteliais alveolares do tipo I, por interação com células do hospedeiro, como proteínas surfactantes, vitronectina e fibronectina. O genoma de *Pneumocystis* contém cerca de 100 genes que codificam para diferentes Msg, no entanto, apenas um gene Msg é expresso por *Pneumocystis* num determinado momento<sup>6</sup>. Os fragmentos das Msg recombinantes (MsgA, MsgB e MsgC) têm sido utilizados para estudar a resposta

humoral de *Pneumocystis*, em particular o terminal carboxilo do fragmento MsgC e algumas variantes deste fragmento (MsgC1, MsgC3, MsgC8 e MsgC9), que são fortemente reconhecidas por anticorpos no soro dos doentes seropositivos para VIH que recuperam da PPC<sup>14</sup>. *Blount et al.*<sup>15</sup> desenvolveram um antígeno recombinante sobrepondo os três fragmentos MsgA, MsgB e MsgC1, onde verificaram que de entre os três fragmentos a MsgC1 parece ser a mais conservada.

#### 1.1.5.1 Antígeno sintético recombinante multiepítopo

O antígeno sintético recombinante multiepítopo (ou antígeno rsm), desenvolvido pela Mestre Ana Tomás<sup>16</sup>, resulta da seleção de três fragmentos hidrofílicos da fração MsgC de *P. jirovecii*, ligados entre si por duas pontes de cinco resíduos de glicina. As pontes de glicina permitem criar duas “dobradiças” não reativas, para que os três fragmentos adquiram a sua estrutura tridimensional normal, tendo uma distância entre si que permita a interação dos anticorpos com os seus epítomos<sup>16</sup>.

O **Quadro 1.1** resume a constituição do antígeno rsm. Este é constituído por 152 aminoácidos, tem um peso molecular de 16,7 kDa e o ponto isoelétrico (pI) é igual a 8,57<sup>16</sup>. Apresenta um índice de instabilidade baixo de 38,39 o que reflete a sua estabilidade, bem como baixo índice de hidropaticidade (-0,702), uma vez que é constituído por regiões altamente hidrofílicas<sup>16</sup>.

Quadro 1.1 Parâmetros físico-químicos do antígeno rsm. Segundo<sup>16</sup>.

Parâmetros físico-químicos	
Número de aminoácidos	152
Peso molecular (kDa)	16,7
Ponto isoelétrico	8,57
Índice de instabilidade	38,39
Índice de hidropaticidade	-0,702

### 1.1.6 Diagnóstico

#### 1.1.6.1 Diagnóstico presuntivo

O diagnóstico presuntivo consiste na apresentação do quadro clínico, exames radiológicos, testes de função pulmonar, gasometria arterial em repouso e após exercício e exames laboratoriais de rotina<sup>2</sup>. Os doentes com PPC, normalmente desenvolvem dispneia, que aumenta ao longo do tempo, tosse não produtiva ou com expectoração clara, febre baixa ou ausência de febre, mal-estar e às vezes

aperto no peito ou dor no peito. Todavia, o quadro clínico varia de pessoa para pessoa e muitos processos infecciosos e não infecciosos podem ter apresentação clínica idêntica<sup>12</sup>.

A característica mais comum de um exame radiológico em doentes com PPc traduz-se por um infiltrado intersticial bilateral e simétrico, tornando-se mais homogéneo e difuso com o aumento da gravidade da infeção<sup>2,12</sup>. Uma pressão parcial do oxigénio no sangue periférico (PaO<sub>2</sub>) inferior a 65 mmHg, num doente com suspeita clínica e radiológica, é indicativo da PPC<sup>2,17</sup>.

A contagem das células T CD4<sup>+</sup> é um parâmetro importante que permite determinar o risco de adquirir a PPC, sendo que o risco aumenta quando a contagem de células T CD4<sup>+</sup>, no sangue periférico, é inferior a 200 células/mm<sup>3</sup><sup>1,2</sup>.

Nível sérico elevado de lactato desidrogenase (LDH) é sugestivo da pneumonia por *Pneumocystis* em doentes seropositivos para VIH. Porém, um nível sérico elevado de LDH não é específico da PPC, uma vez que pode estar associado a outras doenças pulmonares<sup>1</sup>.

Outras estratégias de diagnóstico já foram propostas, como a medição dos níveis séricos de (1-3)- $\beta$ -D-glucano (BG), do antígeno *Krebs von den Lungen-6* (KL-6) ou de S-adenosilmetionina (SAM). BG é um polissacárido presente na parede celular de *P. jirovecii*, sendo que doentes com PPC apresentam níveis séricos altos de BG<sup>17</sup> que também podem ser observados em doentes com outras infeções fúngicas, como histoplasmose disseminada<sup>1</sup>. Outros estudos demonstraram que os níveis séricos do antígeno KL-6 estão aumentados em doentes com PPC, revelando que este antígeno é um potencial indicador desta patologia<sup>17,18</sup>. Enquanto os níveis séricos de SAM, um intermediário metabólico na reação de metilação e de síntese de poliaminas, têm mostrado resultados questionáveis. Ao contrário da maioria dos outros microrganismos patogénicos, as espécies de *Pneumocystis* parecem ter a necessidade de SAM exógena, uma vez que são incapazes de sintetizar SAM endogenamente. Uns autores defendem que níveis séricos baixos de SAM sugerem a presença da PPC, enquanto outros autores defendem que *Pneumocystis* codifica um gene funcional de SAM sintetase<sup>1,17</sup>.

#### 1.1.6.2 Diagnóstico definitivo

O diagnóstico clínico da PPC é complexo visto que o quadro clínico, os exames radiológicos e a análise bioquímica do sangue não são específicas para a PPC, por este motivo é necessário recorrer a técnicas de diagnóstico mais sensíveis e específicas<sup>12</sup>.

Uma vez que não existe um processo sustentado, estável e reprodutível da cultura de *P. jirovecii*, o diagnóstico definitivo da PPC consiste na deteção destes microrganismos em amostras



respiratórias<sup>2,19</sup>. Estas podem ser obtidas por técnicas invasivas, como exemplo o lavado broncoalveolar (LBA) que é obtido por broncofibroscopia ou a biópsia de tecido pulmonar, ou então por técnicas menos invasivas, como por exemplo a indução de expetoração. No entanto, o LBA não é fácil de obter ou de repetir em doentes com PPc, particularmente em doentes seropositivos para VIH ou em crianças, enquanto a expetoração induzida tem de ser recolhida em clínicas com uma sala apropriada para este tipo de recolha. Todavia, estas técnicas de obtenção de amostras respiratórias são onerosas e difíceis de implementar em países em desenvolvimento<sup>1,19</sup>.

As amostras respiratórias podem ser analisadas por colorações citoquímicas, imunofluorescência com anticorpos monoclonais e técnicas moleculares, como a reação em cadeia de polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*)<sup>19</sup>.

Por microscopia ótica é possível detetar os quistos maduros pelas colorações citoquímicas de azul de toluidina O, Gomori-Grocott metenamina prata ou Giemsa-metanol, enquanto os trofozoítos podem ser detetados pelas colorações de Giemsa e Diff-Quik. Contudo, a visualização das colorações ao microscópio requer técnicos experientes e treinados<sup>3,12</sup>.

Imunofluorescência com anticorpos monoclonais específicos de *Pneumocystis* permite detetar os trofozoítos e os quistos. Esta técnica é mais sensível que as colorações citoquímicas, no entanto, é mais dispendiosa e requer técnicos com experiência laboratorial<sup>1,5</sup>. Na **Figura 1.2** podem observar-se quistos de *Pneumocystis* corados pelas técnicas de a) metenamina de prata e b) imunofluorescência com anticorpos monoclonais, visualizados por microscopia.

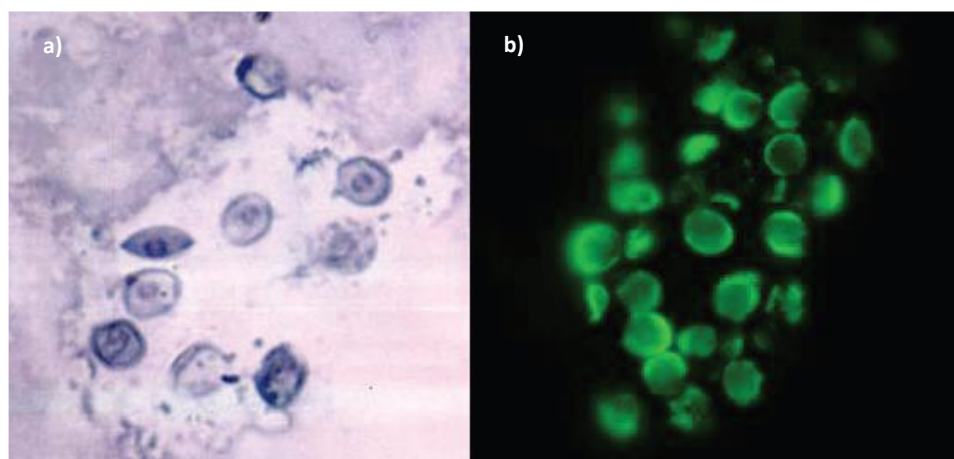


Figura 1.2 Quistos de *P. jirovecii* corados por duas técnicas para o diagnóstico definitivo da PPc em amostras respiratórias. a) Formas quísticas coradas pela técnica de metenamina prata e observadas por microscopia ótica (x1000); b) Formas quísticas coradas pela técnica de imunofluorescência com anticorpos monoclonais e observados por microscopia de fluorescência (x1000). Retirado de<sup>2</sup>.

A utilização de técnicas moleculares permite aumentar a sensibilidade da detecção de *P. jirovecii* em amostras pulmonares, com o intuito de estabelecer o diagnóstico precoce da PPc. A PCR

convencional e em tempo real são os métodos frequentemente utilizados no diagnóstico da PPc, e normalmente fundamentam-se na amplificação da subunidade grande do RNA ribossômico mitocondrial. Porém, por PCR é possível obter falso-positivos, ou seja, é difícil de distinguir entre os casos de colonização por *P. jirovecii* dos casos de doença por PPc<sup>3,12</sup>.

Tal como mencionado, as amostras respiratórias são colhidas por técnicas invasivas e muitas vezes não são fáceis obter. Além de que, nos países em desenvolvimento é difícil de implementar as técnicas de diagnóstico e os métodos para obtenção das amostras respiratórias, uma vez que requerem técnicos especializados, equipamento dispendioso e estruturas que por vezes não existem no terreno<sup>2</sup>. Por este motivo, surge a necessidade de desenvolver um teste de diagnóstico rápido (TDR) da infeção por *P. jirovecii*, com recurso a métodos menos onerosos e a amostras biológicas obtidas de forma menos invasiva (como por exemplo o sangue) e de fácil interpretação.

### ***1.1.7 Profilaxia e tratamento da pneumonia por *Pneumocystis jirovecii****

#### **1.1.7.1 Profilaxia**

A quimioprofilaxia é essencial para os doentes imunocomprometidos e com elevado risco da PPc. As recomendações para a quimioprofilaxia devem ter em atenção os efeitos secundários, o risco de desenvolver resistência aos fármacos e o custo da intervenção profilática. A intervenção pode ser dirigida contra o primeiro episódio da PPc (profilaxia primária) ou PPc recorrente (profilaxia secundária)<sup>12</sup>.

Na profilaxia primária, as diretrizes recomendam o seu início em adolescentes e adultos seropositivos para VIH, incluindo grávidas e doentes submetidos à TARV, quando a contagem de células T CD4<sup>+</sup> for inferior a 200 células/mm<sup>3</sup>. A profilaxia primária deve ser descontinuada em adolescentes e adultos seropositivos para VIH que respondam à TARV, com o aumento da contagem de células T CD4<sup>+</sup> superior a 200 células/mm<sup>3</sup>, por um período superior a três meses. Todavia, a profilaxia deve ser reintroduzida se a contagem de células T CD4<sup>+</sup> diminuir para valores inferiores a 200 células/mm<sup>3</sup><sup>12</sup>.

Relativamente aos doentes imunocomprometidos seronegativos para VIH, a quimioprofilaxia deve ser iniciada quando o risco da PPc for superior a 3,5% e deve ser continuada enquanto as condições imunossupressoras se mantiverem ativas<sup>12</sup>.

A profilaxia secundária deve ser instituída em doentes seropositivos para VIH que já tenham tido episódios anteriores da PPc. A quimioprofilaxia deve ser descontinuada quando estes doentes

apresentarem uma contagem de células T CD4<sup>+</sup> superior a 200 células/mm<sup>3</sup>, por um período de três meses, como resultado da TARV. Se a contagem diminuir novamente, abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup>, a profilaxia deve ser reintroduzida<sup>12</sup>.

O fármaco trimetopim-sulfametoxazol (TMP-SMZ) é o agente profilático recomendado tanto para os doentes imunocomprometidos seropositivos para VIH como para os imunocomprometidos seronegativos para VIH, devido à sua elevada eficácia, relativa segurança, baixo custo e amplo espectro antimicrobiano<sup>12</sup>.

#### 1.1.7.2 Tratamento

Como a PPc pode progredir rapidamente e como a taxa de mortalidade permanece elevada, particularmente em doentes imunocomprometidos seronegativos para VIH, o tratamento precoce é essencial. A classificação da PPc em doença leve, moderada ou grave funciona como um indicador para a escolha do fármaco para tratamento, além de que ajuda a decidir se a terapia adjuvante com corticosteroides é indicada<sup>12</sup>. O fármaco de primeira linha utilizado na tratamento da PPc é o TMP-SMZ, uma vez que permite obter uma rápida resposta clínica comparativamente aos outros fármacos. A segunda linha de tratamento consiste em fármacos como pentamidina, atovaquona, primaquina-clindamicina, entre outros<sup>6</sup>.

## 1.2 Nanotecnologia e Nanopartículas de Ouro

### 1.2.1 Nanopartículas de ouro

A emergência da nanotecnologia desencadeou uma intensa investigação sobre as propriedades à escala nano (10<sup>-9</sup>) de diversos materiais, nomeadamente as nanopartículas de ouro (AuNP)<sup>20</sup>. Estas nanopartículas, geralmente constituídas por *clusters* de átomos de metal (3 a 10<sup>7</sup> átomos), apresentam propriedades óticas, eletrónicas e químicas significativamente diferentes das propriedades do ouro à macroescala<sup>20,21</sup>. As AuNP podem ser utilizadas em biossensores, imunoensaios, genómica, entrega de fármacos no organismo, controlo e deteção de microrganismos, entre outras aplicações<sup>22</sup>.

As AuNP apresentam um diâmetro entre 1 a 100 nm e possuem propriedades óticas notáveis – cor intensa e elevada dispersão de luz – devido à ressonância plasmónica de superfície localizada (LSPR, do inglês *Localized Surface Plasmon Resonance*)<sup>20,23</sup>. Quando uma partícula de metal é exposta à luz, a oscilação do campo magnético da luz induz a oscilação coletiva dos eletrões livres (eletrões da

banda de condução) do metal. Esta oscilação de elétrons em torno da superfície da partícula causa uma separação de cargas em relação à estrutura iônica originando uma oscilação do dipolo ao longo da direção do campo elétrico da luz. A amplitude de oscilação atinge um máximo a uma frequência específica, denominado de LSPR<sup>24,25</sup> (**Figura 1.3**). A LSPR induz uma forte absorção de luz incidente, podendo ser medida com recurso a um espectrofotômetro de ultravioleta-visível (UV-vis). Todavia, este efeito não se verifica nos átomos individualizados, nem à macroescala<sup>23</sup>. Além da LSPR, as AuNP apresentam elevada área de superfície, comportamento espectral modificável, elevada estabilidade e compatibilidade biológica<sup>26</sup>.

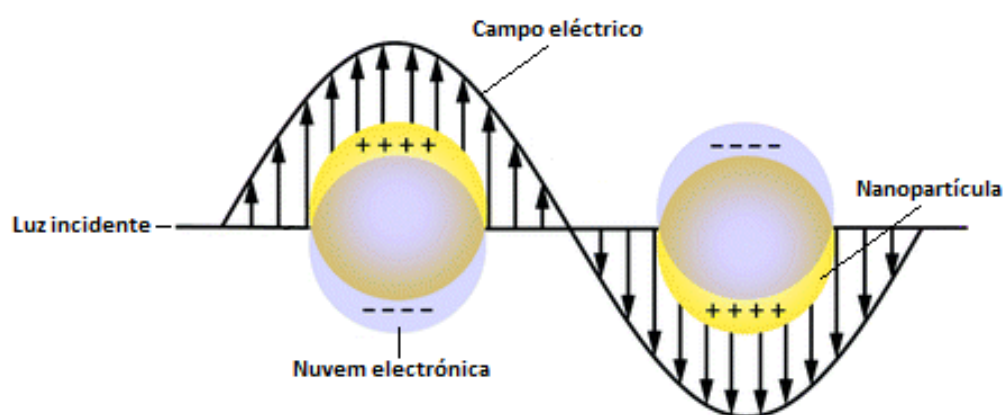


Figura 1.3 Representação esquemática do efeito de LSPR. Indução de um dipolo que oscila em fase com o campo elétrico da luz incidente. Adaptado de<sup>25</sup>.

Tipicamente, uma solução de AuNP esféricas, de diâmetro entre 2 a 40 nm, apresenta cor vermelha devido à banda de LSPR, centrada aproximadamente a 520 nm<sup>20</sup>. O comprimento de onda da LSPR depende do tamanho da partícula, forma, propriedades dielétricas, morfologia dos agregados, modificação da superfície e do índice de refração do meio envolvente<sup>23</sup>.

A alteração das propriedades dielétricas (por exemplo alteração da força iônica ou do pH do meio envolvente) provoca o desvio da banda de LSPR para comprimentos de onda maiores, aproximadamente a 600 nm, e visualmente observa-se a mudança de cor de vermelho para azul-arroxeadado, cor característica de AuNP agregadas<sup>20</sup> (**Figura 1.4**). A agregação das nanopartículas pode ser utilizada no desenvolvimento de biossensores colorimétricos, em que a presença ou ausência de um determinado analito (como exemplo sequência de ácidos nucleicos) impede ou provoca agregação das AuNP, obtendo-se assim um resultado<sup>20</sup>.

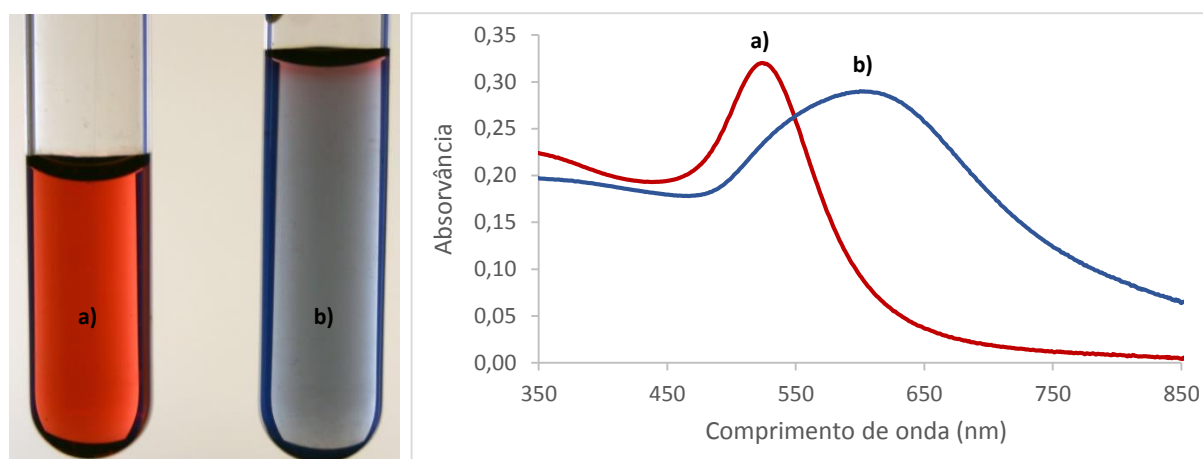
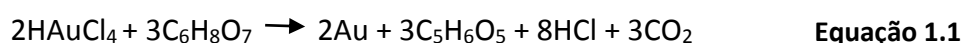


Figura 1.4 Agregação das AuNP pela variação da força iónica do meio envolvente. Nos espectros de UV-vis observam-se as curvas características para as AuNP monodispersas e agregadas. a) Solução de nanopartículas de ouro monodispersas apresenta cor vermelha; b) Solução de AuNP agregadas exibe cor azul-arroxeadada. Adaptado de<sup>27</sup>.

A agregação das AuNP pode ser induzida por diversos fatores: (1) a ausência de um ligando suficientemente forte, para estabilizar as nanopartículas por forças de repulsão (provoca agregação); (2) o aumento da força iónica faz com que as AuNP se aproximem umas das outras através de forças de atração, como interações de dipolo induzido (forças de *van der Waals* ou pontes de hidrogénio), (promovendo a agregação); (3) dependendo do pI e do pH da solução, as AuNP podem perder ou alterar a sua carga superficial<sup>28,29</sup>. A estabilidade coloidal é o maior indicador de qualidade da solução de AuNP, sendo que a agregação das partículas constitui a perda da propriedade coloidal<sup>21</sup>.

A utilização bem-sucedida das AuNP em ensaios biológicos fundamenta-se na variabilidade de métodos de síntese que permitem obter nanopartículas com características desejáveis, nomeadamente elevada solubilidade em água, morfologia adequada, dispersão de tamanho e superfícies funcionalizáveis. O controlo da forma e do tamanho das nanopartículas é normalmente conseguido pela seleção cuidadosa das condições experimentais, tais como tempo de reação, temperatura, agente redutor e de revestimento<sup>30</sup>.

Devido à simplicidade e elevado rendimento<sup>30</sup> as AuNP são frequentemente sintetizadas pelo método de *Turkevich*<sup>31</sup>, posteriormente desenvolvido por *Kimling*<sup>32</sup>. Este método consiste na redução de ouro(III) (HAuCl<sub>4</sub>) a ouro(0) (Au) em solução aquosa pelo agente redutor e de estabilização citrato de sódio (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>), a 100°C, sob agitação vigorosa (**Equação 1.1**). Após alguns minutos obtém-se uma solução coloidal de nanopartículas de ouro entre 10 a 20 nm de diâmetro<sup>23</sup>. As AuNP esféricas apresentam uma banda de absorção entre 510 e 550 nm. Para AuNP de 15 nm de diâmetro a LSPR tem um máximo de absorvância centrado a 520 nm, característico da cor vermelha<sup>33</sup>.



O citrato de sódio liga-se à superfície das nanopartículas não só para impedir o crescimento descontrolado das nanopartículas no decurso da síntese, mas também para evitar a agregação devido a repulsões eletrostáticas. Os iões citrato conferem carga negativa à superfície das nanopartículas estabilizando-as<sup>29,33</sup>. Esta propriedade pode ser explorada para interações eletrostáticas com algumas biomoléculas carregadas positivamente, tal como os anticorpos. As nanopartículas de ouro são compatíveis com anticorpos e antigénios além de que, não afectam a actividade funcional destas biomoléculas após a imobilização. Por este motivo, podem ser utilizadas na detecção de um analito específico. A funcionalização da superfície das nanopartículas pode acelerar a reação anticorpo-antigénio, o que permite amplificar o sinal por exemplo em ensaios imunocromatográficos<sup>33</sup>.

### 1.2.2 Funcionalização das nanopartículas de ouro

Os iões citrato podem ser facilmente substituídos por outros ligandos que se ligam mais fortemente à superfície das AuNP, conferindo-lhes novas propriedades ou funcionalidades<sup>34</sup>, tais como o ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) ou o pentapéptido CALNN (Cisteína, Alanina, Leucina, Asparagina, Asparagina).

O MUA é uma molécula bifuncional constituída por um grupo tiol (-SH) na extremidade N-terminal, uma cadeia alifática e um grupo carboxilo (-COOH) na extremidade C-terminal (**Figura 1.5**). A formação de uma camada densa de cadeias alifáticas em torno das nanopartículas, bem como a presença de grupos carregados ajudam na estabilização da solução coloidal<sup>35</sup>. As AuNP funcionalizadas com MUA (AuNP-MUA) são indicadas para a conjugação com proteínas através de interações eletrostáticas complementares<sup>36</sup>.

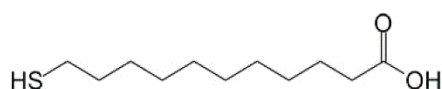


Figura 1.5 Estrutura do ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA). Retirado de<sup>37</sup>.

O CALNN foi desenvolvido com o propósito de apresentar elevada afinidade para o ouro, ter a capacidade de formar uma camada densa em torno das nanopartículas por forma a excluir a água e conter um grupo hidrofílico que garante a estabilidade e a solubilidade das nanopartículas em água. O grupo tiol na extremidade N-terminal do resíduo cisteína (C) permite a formação de uma ligação covalente com a superfície das AuNP. Os resíduos alanina (A) e leucina (L) possuem cadeias laterais hidrofóbicas que promovem a auto-montagem do péptido. Os dois resíduos asparagina (N) não carregados apresentam cadeias laterais hidrofílicas. Enquanto a extremidade C-terminal contém um

grupo carboxilo que pode apresentar carga negativa (**Figura 1.6**)<sup>38,39</sup>. As AuNP funcionalizadas com CALNN (AuNP-CALNN) apresentam um ambiente favorável para a conjugação com proteínas, além de que permitem manter a bioatividade das proteínas<sup>40</sup>.

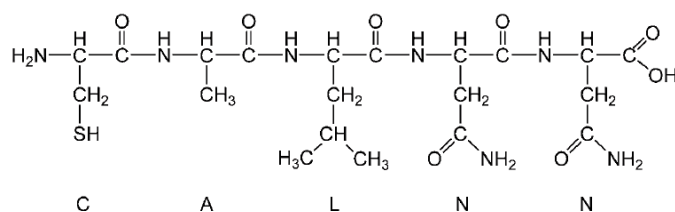


Figura 1.6 Estrutura do pentapéptido CALNN. Retirado de<sup>39</sup>.

A funcionalização com um ligando mais forte pode tornar as nanopartículas mais estáveis no que diz respeito à possível agregação a elevada força iônica ou a pH ácido. O grupo carboxilo estabiliza as nanopartículas por repulsão eletrostática além de que, permite a conjugação de outras moléculas com as AuNP. Por sua vez, o grupo tiol apresenta forte afinidade para as superfícies dos metais nobres, especialmente para o ouro. A ligação do átomo de enxofre ao átomo de ouro é classificada como ligação quasi-covalente<sup>29,34,35</sup>.

### 1.2.3 Bionanoconjugados

Na natureza existe uma ampla variedade de moléculas orgânicas de composição, tamanho e complexidade diferentes para a bionanoconjugação. Existem por exemplo moléculas pequenas como lípidos, vitaminas, péptidos, açúcares e por outro lado moléculas maiores como proteínas, enzimas, DNA e RNA. A conjugação das nanopartículas de ouro com as biomoléculas gera materiais híbridos, denominados por bionanoconjugados, que permitem que as nanopartículas interajam especificamente com os sistemas biológicos. Os bionanoconjugados AuNP-biomolécula adquirem em conjunto propriedades e funcionalidades únicas para ambos os materiais, por exemplo as propriedades óticas das AuNP e a capacidade das biomoléculas se ligarem especificamente à molécula de reconhecimento<sup>29</sup>.

A formação dos bionanoconjugados pode ser conseguida por (1) interações eletrostáticas das biomoléculas carregadas positivamente às nanopartículas carregadas negativamente ou vice-versa; (2) ligação à superfície da nanopartícula geralmente por adsorção química usando grupos tiol (MUA e CALNN); (3) ligação covalente por conjugação química, explorando os grupos funcionais quer da nanopartícula quer da biomolécula; e (4) ligação não covalente, sistemas de afinidade (como por exemplo sistema avidina-biotina)<sup>29,35</sup>.

Um exemplo de ligação covalente por conjugação química consiste na formação de uma ligação amida entre as nanopartículas com os grupos carboxilo e os grupos amina presentes nas proteínas, utilizando os agentes de reticulação cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/N-hidroxisuccinimida (NHS)<sup>35</sup>.

As nanopartículas de ouro exibem propriedades óticas, eletrônicas e magnéticas únicas, enquanto as proteínas possuem propriedades notáveis de reconhecimento, catalíticas e de inibição. A associação destes dois elementos permite formar bionanoconjugados com propriedades e funções sinérgicas<sup>41</sup>. As interações AuNP-proteína podem ser avaliadas por técnicas de espectroscopia que permitem determinar a constante de ligação, a razão de proteína à superfície das AuNP, bem como o mecanismo de adsorção das proteínas à superfície das partículas. Exemplos dessas técnicas são espectroscopia de UV-vis, dispersão de luz dinâmica e dicroísmo circular<sup>42</sup>.

Neste estudo, as AuNP funcionalizadas com MUA, MUA-EDC/NHS ou CALNN foram conjugadas com o antígeno rsm para formar os bionanoconjugados AuNP-MUA-Antígeno, AuNP-MUA-EDC/NHS-Antígeno e AuNP-CALNN-Antígeno.

#### 1.2.4 Ensaios de fluxo lateral

A aplicação mais recorrente e conhecida dos ensaios de fluxo lateral (LFA, do inglês *Lateral Flow Assay*) é o teste de gravidez, que permite detetar a hormona gonadotrofina coriônica humana através de uma amostra de urina. A tecnologia dos LFA tem sido amplamente explorada o que possibilita a detecção de uma vasta gama de analitos, como por exemplo agentes infecciosos (bactérias, vírus), hormonas, fármacos, pesticidas e micotoxinas. Os LFA permitem o rápido diagnóstico, visto que se obtém o resultado entre 2 a 5 min, tipicamente, e podem ser utilizadas amostras de urina, sangue, plasma ou saliva<sup>43,44</sup>.

Os LFA destacam-se pela portabilidade o que permite que sejam utilizados em áreas remotas, onde os equipamentos de alta tecnologia não se encontram disponíveis, como são fáceis de utilizar não requerem técnicos especializados para interpretar os resultados, apresentam baixo custo de produção, requerem pequenos volumes e apresentam elevada sensibilidade e especificidade<sup>45</sup>.

Tradicionalmente, qualquer teste de LFA é constituído por diversos segmentos que se sobrepõem numa placa de apoio, montados dentro de um invólucro de plástico. Esses segmentos incluem a zona de aplicação, zona de conjugação, zona de detecção e zona de absorção. Por forma a garantir o correto funcionamento do LFA, é necessário que todos os componentes sejam hidrofílicos e



que todos os segmentos se encontrem sobrepostos entre eles para garantir o fluxo contínuo da amostra<sup>46,47</sup>.

Os ensaios de fluxo lateral fundamentam-se no princípio imunocromatográfico no qual a amostra a analisar migra através de um suporte sólido por ação capilar. Depois de aplicar a amostra na zona de aplicação, esta migra até à zona de conjugação que contém partículas conjugadas previamente imobilizadas. Normalmente, na zona de conjugação utilizam-se AuNP conjugadas com biomoléculas (antigénio ou anticorpo) específicas para o analito a detetar. A amostra continua a migrar por ação capilar através da zona de deteção, constituída por uma membrana porosa, sobre a qual outras biomoléculas específicas do teste foram imobilizadas. Tipicamente utilizam-se proteínas, anticorpos ou antigénios, que previamente foram imobilizados na linha de teste e na linha de controlo. A linha de teste e a linha de controlo têm como objetivo capturar o analito e o excesso de conjugado, respetivamente. A zona de absorção tem por finalidade absorver o excesso de reagentes. O resultado obtido pode ser qualitativo do tipo “sim/não”, visualizado a olho nu, ou semiquantitativo utilizando um leitor de testes de LFA<sup>46,48</sup>.

Existem dois tipos de formato de LFA: direto ou competitivo. O formato direto permite detetar moléculas com elevado peso molecular no qual dois anticorpos se podem ligar simultaneamente ao analito. Enquanto o formato competitivo possibilita a deteção de moléculas com menor peso molecular, onde apenas se pode ligar um anticorpo. Independentemente do formato utilizado, a linha de controlo é sempre visível, para confirmar que a amostra migra de forma adequada através do dispositivo<sup>44,46</sup>.

As AuNP são frequentemente empregues nos LFA visto que são fáceis de sintetizar numa vasta gama de tamanhos e formas, podem ser modificadas com vários ligandos, demonstram elevada biocompatibilidade para as biomoléculas além de que, apresentam propriedades óticas únicas o que permite aumentar a sensibilidade dos LFA<sup>47</sup>.

#### 1.2.4.1 Teste de diagnóstico rápido de *Pneumocystis jirovecii*

Futuramente com este estudo será possível desenvolver um teste de diagnóstico rápido da PPc, baseado na tecnologia dos LFA. Este TDR permitirá detetar anticorpos do microrganismo em amostras biológicas de obtenção menos invasiva, como por exemplo o sangue.

Inicialmente as nanopartículas de ouro esféricas serão funcionalizadas com um agente de revestimento por forma a aumentar a estabilidade das AuNP e promover a conjugação controlada do antigénio. Seguidamente, as AuNP serão conjugadas com o antigénio recombinante sintético

multiepitopo para a formação dos bionanoconjugados AuNP-Antigénio. Os bionanoconjugados têm como papel principal o reconhecimento de anticorpos contra *P. jirovecii*, presentes na amostra biológica, e serão depositados na zona de conjugação.

A zona de deteção será constituída por exemplo por uma membrana de nitrocelulose, onde existirão duas linhas nas quais funcionará o teste. Na linha de teste será imobilizado um anticorpo anti-imunoglobulina M humano (anti-IgM humano) contra os anticorpos anti-*P. jirovecii*. Enquanto na linha de controlo será imobilizado um anticorpo policlonal produzido contra o antigénio rsm anti-*P. jirovecii* (anti-Antigénio) capaz de detetar esta proteína recombinante.

Depois de aplicar a amostra biológica na zona de aplicação, esta migra por ação capilar até à zona de conjugação que contém os bionanoconjugados AuNP-Antigénio. Nesta etapa, o anticorpo anti-*P. jirovecii* liga-se especificamente aos bionanoconjugados, devido à forte ligação entre o anticorpo e o antigénio rsm. Na zona de deteção, através de ligações competitivas, o anticorpo anti-*P. jirovecii* irá ou não ligar-se na linha de teste, consoante se encontre ou não no produto biológico a analisar. A **Figura 1.7** representa um esquema do TDR que futuramente será possível desenvolver.

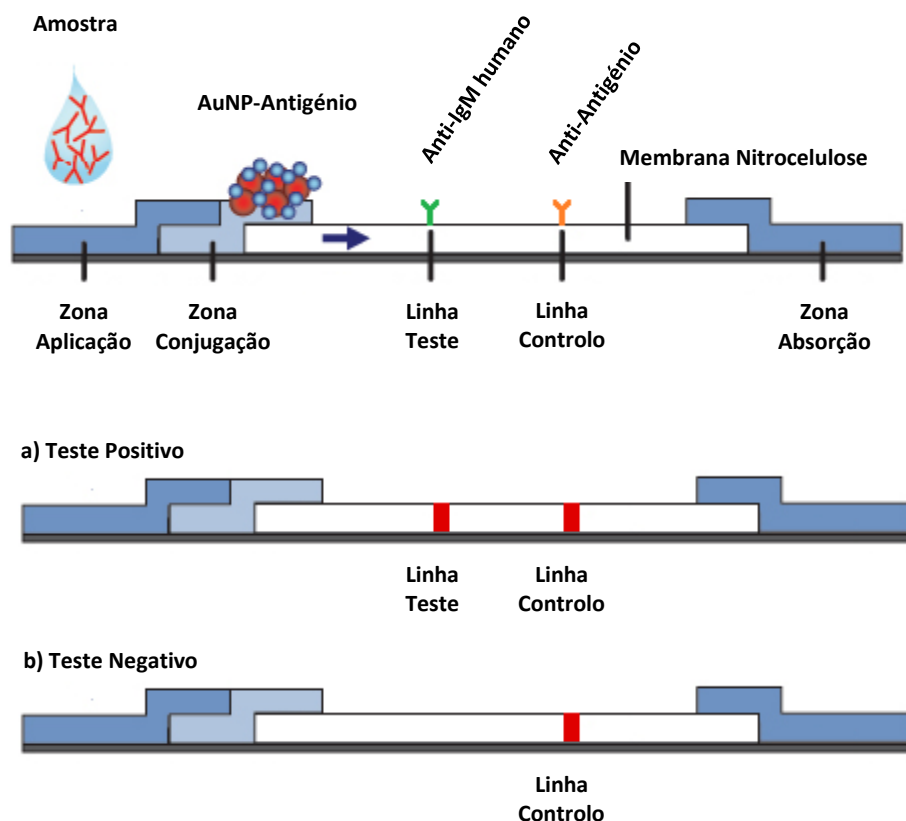


Figura 1.7 Esquema do TDR para detetar anticorpos anti-*P. jirovecii*. a) Resultado para um teste positivo; b) Resultado para um teste negativo. Adaptado de<sup>49</sup>.

Num teste positivo, o anticorpo anti-*P. jirovecii* liga-se aos bionanoconjugados AuNP-Antigénio na zona de conjugação. Estes migram pela membrana de nitrocelulose e o anticorpo anti-*P. jirovecii* liga-se ao anticorpo anti-IgM humano, imobilizado na linha de teste. O excesso dos bionanoconjugados AuNP-Antigénio ligam-se ao anticorpo anti-Antigénio imobilizado na linha de controlo. O resultado serão duas linhas vermelhas.

No caso do teste negativo, o anticorpo anti-*P. jirovecii* não está presente no produto biológico. Os bionanoconjugados AuNP-Antigénio migram pela membrana de nitrocelulose e ligam-se apenas ao anticorpo anti-Antigénio, imobilizado na linha de controlo. O resultado será somente uma linha vermelha.

Para o correto funcionamento do TDR da PPC, será necessário garantir que existe um excesso dos bionanoconjugados AuNP-Antigénio na zona de conjugação, de forma a garantir a visualização da linha de controlo quer no teste positivo como no teste negativo.

## 1.3 Técnicas gerais

### 1.3.1 *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

O teste ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) consiste num imunoensaio enzimático, no qual uma enzima conjugada com um anticorpo secundário se liga ao complexo anticorpo primário-antigénio. Na presença de substrato, a enzima catalisa a produção de cor, o que permite obter uma resposta qualitativa e quantitativa. A fosfatase alcalina ou a peroxidase são exemplos de enzimas frequentemente utilizadas<sup>50,51</sup>.

Este tipo de ensaios imunoenzimáticos requer a separação do antigénio alvo dos complexos não específicos. A separação é conseguida pela ligação do antigénio ou do anticorpo de captura numa matriz sólida, por exemplo uma microplaca de poliestireno. Esta matriz sólida permite separar o antigénio dos complexos não específicos através de diversas lavagens, de forma a minimizar as interações não específicas<sup>50</sup>.

Os testes ELISA são regularmente utilizados para o diagnóstico de agentes infecciosos como por exemplo vírus, ou outros componentes presentes no sangue (tais como proteínas, anticorpos ou hormonas). Estes testes podem adquirir vários formatos: direto, indireto ou *sandwich*. O antigénio em estudo pode ser imobilizado por adsorção direta à microplaca de ELISA ou indiretamente via um anticorpo de captura que previamente foi imobilizado na microplaca. O antigénio é posteriormente detetado por um anticorpo primário marcado enzimaticamente (formato direto) ou por um anticorpo

secundário marcado enzimaticamente (formato indireto). No formato *sandwich*, o antígeno em estudo encontra-se ligado entre dois anticorpos primários – o anticorpo de captura e o anticorpo de detecção<sup>50–52</sup>. A **Figura 1.8** apresenta os vários formatos de ELISA.

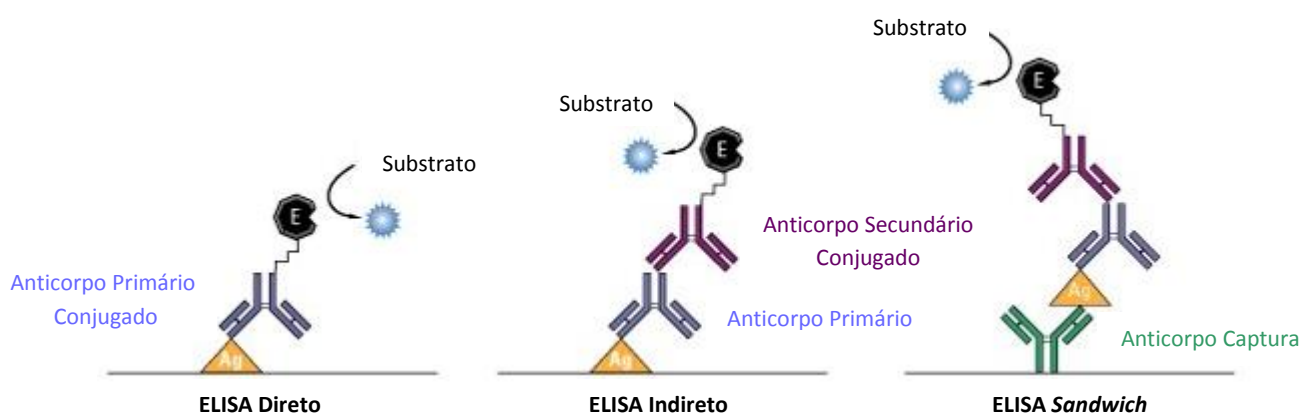


Figura 1.8 Diferentes formatos de ELISA: direto, indireto e de sandwich. Adaptado de<sup>53</sup>.

Para este estudo utilizou-se o formato de ELISA indireto. Depois de imobilizar o antígeno rsm na microplaca, este será detetado por um anticorpo primário. Por sua vez, um anticorpo secundário conjugado com a enzima fosfatase alcalina ligar-se-á ao anticorpo primário e na presença de substrato haverá formação de cor amarela. Desta forma, será possível confirmar a presença do antígeno rsm após a sua purificação por técnicas cromatográficas.

### 1.3.2 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose é amplamente utilizada para separar sistemas biológicos como DNA e proteínas com elevada resolução. Todavia, esta técnica também permite separar nanomateriais<sup>54</sup>. A mobilidade eletroforética das nanopartículas depende do tamanho e da carga das nanopartículas, da força do campo elétrico aplicado, bem como da fricção entre as partículas e a matriz porosa<sup>55,56</sup>. A **Equação 1.2** permite calcular a mobilidade eletroforética ( $\mu$  em  $\text{cm}^2/\text{V.s}$ ), onde  $v$  representa a velocidade de migração ( $\text{cm/s}$ ) e  $E$  o campo elétrico ( $\text{V/cm}$ )<sup>57</sup>.

$$\mu = \frac{v}{E}$$

**Equação 1.2**

A porosidade do gel de agarose é controlada pela concentração de agarose utilizada na preparação do mesmo. Uma elevada concentração de agarose permite obter um gel com poros de tamanho pequeno e vice-versa. O processo de gelificação resulta da formação de pontes de hidrogénio

intra e intermoleculares entre as longas cadeias de agarose. A agarose é um polissacárido linear constituído por repetição de unidades de agarobiose<sup>52</sup>.

A eletroforese em gel de agarose apresenta vantagens relativamente à eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE, do inglês *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel*). O gel de SDS-PAGE apresenta poros de tamanho entre 3 a 5 nm, enquanto a separação ou purificação das nanopartículas requer matrizes com poros de maior tamanho. Além de que, o gel de SDS-PAGE exibe heterogeneidade no tamanho dos poros que se formam por polimerização dos radicais livre<sup>54</sup>.

Para o presente estudo, pretende-se utilizar a eletroforese em gel de agarose para avaliar a formação dos bionanoconjugados AuNP-Antigénio. Às AuNP previamente funcionalizadas com MUA, MUA-EDC/NHS ou CALNN serão adicionadas diferentes razões molares do antigénio rsm. Por eletroforese em gel de agarose será possível avaliar qual dos ligandos favorece a conjugação das AuNP com o antigénio, bem como determinar qual a razão molar de antigénio ideal para revestir cada nanopartícula com o antigénio.

## 1.4 Objectivo do estudo

O presente estudo tem por objetivo produzir o antigénio recombinante sintético multiepítopo, específico de *P. jirovecii*. Posteriormente, o antigénio será conjugado com nanopartículas de ouro esféricas para a formação dos bionanoconjugados AuNP-Antigénio estáveis e robustos, com vista ao desenvolvimento de um teste de detecção rápida de *P. jirovecii*.

**Página em Branco**

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente foi necessário expressar, produzir e purificar o antígeno recombinante sintético multiepítopo. Posteriormente, procedeu-se à síntese das AuNP e à formação dos bionanoconjugados AuNP-Antígeno. A metodologia aplicada encontra-se esquematizada na **Figura 2.1**.

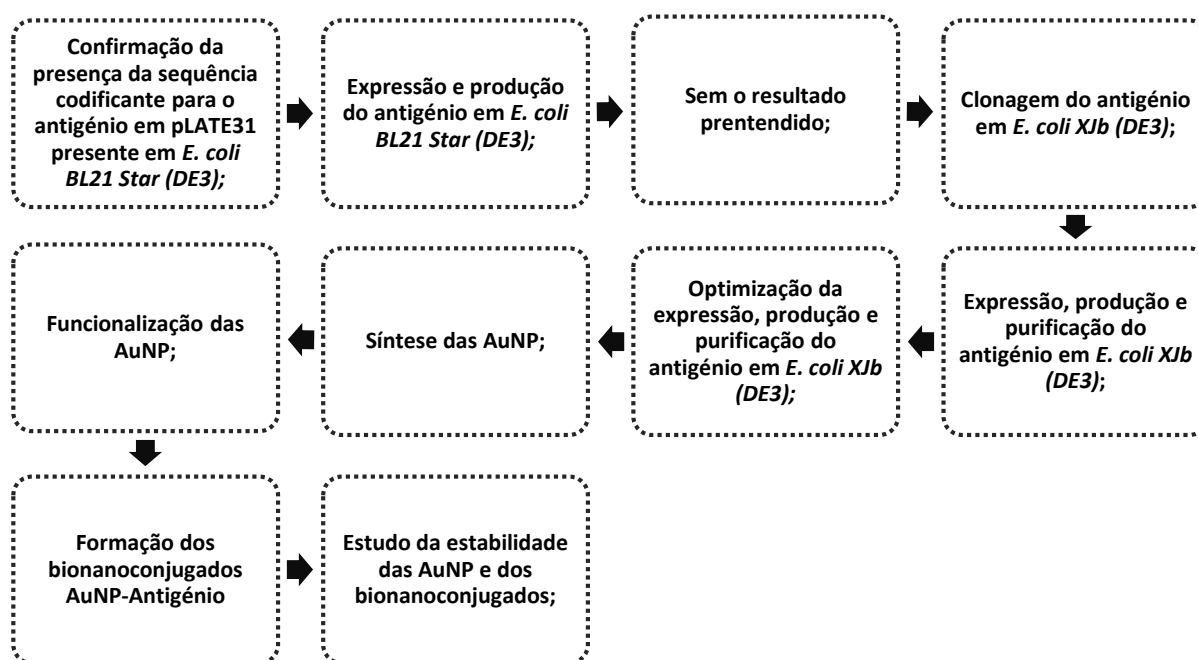


Figura 2.1 Fluxograma da metodologia aplicada correspondente à expressão, produção e purificação do antígeno, assim como à formação e estudo da estabilidade dos bionanoconjugados.

### 2.1 Confirmação da presença da sequência codificante para o antígeno em pLATE31, presente em *E. coli* BL21 Star (DE3)

A sequência do antígeno rsm foi inserida no vetor de expressão pLATE31, em *Escherichia coli* BL21 Star (DE3), pela Mestre Ana Tomás<sup>16</sup>. Este vetor de expressão permite expressar o antígeno com uma cauda de seis histidinas na extremidade C-terminal. Os elementos genéticos que constituem o vetor apresentam-se no **Anexo 1 (Figura A.1 e Quadro A.1)**.

Para confirmar a presença da sequência codificante para o antígeno, inoculou-se uma placa de Petri contendo meio *Luria Broth* (LB; Nzytech) com ampicilina (Nzytech) a 100 µg/mL com a cultura *E. coli* BL21 Star (DE3), contendo o vetor de expressão de interesse. Incubou O.N. a 37°C, verificando-se o aparecimento de colónias individualizadas. Selecionaram-se aleatoriamente 10 colónias individualizadas, que posteriormente foram repicadas para outra placa de Petri contendo meio LB Agar

(Nzytech) com o antibiótico utilizado anteriormente. Incubou *O.N.* a 37°C. Após crescimento a placa foi guardada a 4°C, para se utilizar posteriormente. O plasmídeo apresenta uma marca de seleção à ampicilina, como tal adicionou-se este antibiótico a todos os meios de cultura para garantir a seleção de células que apresentam resistência a este antibiótico.

Posteriormente, procedeu-se à técnica de PCR-colónia<sup>58</sup> por forma a amplificar o DNA plasmídico das 10 colónias isoladas. A composição da mistura de PCR encontra-se descrita no **Quadro 2.1**. A sequência dos *primers* que permitem obter o amplicão relativo à sequência de inserção do antígeno no vetor de expressão pLATE31 encontra-se descrita no **Quadro A.2** (ver no **Anexo 1**). A amostra de DNA obteve-se tocando com a ansa de repicagem na colónia e de seguida tocando no respetivo tubo de PCR. Por forma a monitorizar a qualidade dos resultados utilizaram-se dois controlos. O controlo negativo consistiu em 2 µL de água desionizada estéril em vez da amostra de DNA, enquanto para o controlo positivo se utilizou 2 µL do vetor de clonagem pUC57-Amp que continha a sequência codificante para o antígeno.

Quadro 2.1 Composição da mistura de PCR para confirmação da presença da sequência do antígeno *rsm* em *E. coli* BL21 Star (DE3).

Reagentes	Volume por tubo de PCR (µL)
Água desionizada estéril	34,8
Tampão de PCR 10x ( <i>Bioline</i> )	5
10 mM de cada dNTP ( <i>Applied Biosystems</i> )	2
Primer pLATE31Fw 10 µM ( <i>MWG Biotech</i> )	0,5
Primer pLATE31Rv 10 µM ( <i>MWG Biotech</i> )	0,5
Cloreto de magnésio 25 mM (MgCl <sub>2</sub> ; <i>Bioline</i> )	5
TaqGold 5 U/µL ( <i>Applied Biosystems</i> )	0,2
Volume final	48

As condições aplicadas na PCR encontram-se resumidas no **Quadro 2.2.**, tendo o ensaio decorrido num termociclador (*Biometra T1 Thermocycler*).



Quadro 2.2 Condições aplicadas na PCR para confirmação da sequência do antígeno rsm em *E. coli* BL21 Star (DE3).

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Nº de ciclos
Ativação da polimerase	95	10	1
Desnaturação	95	0,5	40
Ligação	55	1	
Extensão	72	1	
Extensão final	72	10	1

Findo este passo, recorreu-se à eletroforese em gel de agarose a 1% para confirmar a presença da sequência do antígeno rsm, com um tamanho esperado de 478 pb<sup>16</sup>. Para tal, preparou-se um gel de agarose (*SeaKem LE Agarose*) a 1% em tampão Tris-Acetato-EDTA 1x (TAE; Tris (*AppliChem*) 40 mM; ácido acético (*Riedel-de-Haën*) 20 mM; ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA; *Merck*) 1 mM; pH 8,4) no qual foi incorporado brometo de etídio a 0,5 mg/mL (*Sigma*).

O gel de agarose foi imerso no tampão mencionado anteriormente e aplicou-se 1,5 µL de marcador de pesos moleculares *Gene Ruler 100 bp DNA Ladder* (*Life Technologies*), ao qual se adicionou 1,5 µL de tampão de deposição (*Life Technologies*). Seguidamente, aplicou-se 15 µL de cada produto da reação da PCR com 1,5 µL de tampão de deposição (*Life Technologies*).

A separação eletroforética foi efetuada a 100 V, durante 50 min, recorrendo aos equipamentos *MultiSUB Mini* (*Cleaver Scientific Ltd*) e *EC4000P Series 90 Programmable* (*Apparatus Corporation*). Após a migração estar completa, o gel de agarose foi visualizado num transiluminador (*Syngene*) por ação de radiação ultravioleta. O resultado foi registado com uma máquina fotográfica digital (*PowerShot A710 IS, Canon*) acoplada ao transluminador.

Uma vez confirmada a presença da sequência codificante para o antígeno no vetor de expressão apropriado, a etapa seguinte consistiu na expressão e produção do antígeno recombinante.

## 2.2 Expressão e produção do antígeno em *E. coli* BL21 Star (DE3)

A expressão e produção do antígeno recombinante foi adaptada de *Structural Biology Research Unit – E. coli Growth and Induction with IPTG*<sup>59</sup>. Este ensaio foi realizado em duplicado. Inoculou-se em 25 mL de meio LB com ampicilina a 100 µg/mL uma colónia isolada que incubou a 37°C, com agitação de 140 rpm numa incubadora (*Shaker SK-300, Lab. Companion*). Quando a absorvância

atingiu valores entre 0,6 e 1 a 600 nm, referente à fase exponencial da curva de crescimento celular<sup>60</sup>, adicionou-se isopropil-tio- $\beta$ -D-galactosídeo (IPTG; *Fischer Scientific*) a 1 mM. Incubou-se *O.N.*, a 30°C com agitação de 140 rpm. No dia seguinte, centrifugou-se à temperatura ambiente, durante 10 min a 5002 x g (*Kubota Tabletop Centrifuge Model 4000*, rotor AT-508C). O sedimento foi ressuspensionado em 10 mL de meio LB fresco com cloranfenicol (*Sigma-Aldrich*) a 200  $\mu$ g/mL e deixou-se incubar durante 2 h, a 37°C com agitação de 140 rpm. Centrifugou-se novamente nas condições referidas anteriormente.

O passo seguinte consistiu na lise celular, adaptado de *Open Biotechnology – E. coli Protein Extraction Kit*<sup>61</sup>. Assim, o sedimento foi ressuspensionado em 1 mL de tampão de lisozima (3-(3-colamidopropil)-dimetilamonio)-propano sulfonato (CHAPS (*Carl Roth*) 0,5%; EDTA 1 mM; cloreto de potássio (KCl; *VWR*) 50 mM; lisozima (*Sigma-Aldrich*) 0,75  $\mu$ mol; Tris-HCl 10 mM pH 8,0; Triton X-100 (*Sigma-Aldrich*) 1%) e incubou a 37°C, durante 30 min com agitação de 140 rpm. Procedeu-se a um ciclo de congelação a -20°C, até o lisado estar completamente congelado, e de descongelação à temperatura ambiente, com o intuito de destabilizar a parede celular e por conseguinte ativar a enzima lisozima<sup>61</sup>. Homogeneizou-se a solução e adicionou-se 100  $\mu$ L de tampão DNase I (cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ; *Sigma-Aldrich*) 1 mM; DNase I (*Sigma-Aldrich*) 6,4 nmol; glicerol (87%, *Merck*) 50%; Tris-HCl 10 mM pH 8,0) e 10  $\mu$ L de fluoreto de fenil-metilsulfóxido (PMSF; *Sigma-Aldrich*) a 10 mM, um inibidor de proteases de serina. Homogeneizou-se a solução e incubou-se a 37°C, por um período de 5 min. Após este período, as células foram centrifugadas à temperatura ambiente, durante 5 min, 3717 x g. Finalmente, recolheu-se uma alíquota do sobrenadante e do sedimento para avaliar a expressão e produção do antigénio por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15%.

## 2.3 Clonagem do vetor pLATE31 em *E. coli XJb (DE3)*

O processo de transformação da estirpe bacteriana *E. coli XJb (DE3)* com o vetor de expressão pLATE31 decorreu de acordo com as seguintes etapas:

1. Isolamento do DNA plasmídico de *E. coli BL21 Star (DE3)*;
2. Obtenção de células competentes de *E. coli XJb (DE3)*;
3. Transformação de *E. coli XJb (DE3)* com o vetor de expressão pLATE31;
4. Confirmação da presença do antigénio em *E. coli XJb (DE3)*.

### 2.3.1 Isolamento do DNA plasmídico

Por forma a isolar o DNA plasmídico das células *E. coli* BL21 Star (DE3), recorreu-se ao *kit illustra plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare), seguindo o protocolo proposto pelo fabricante, com algumas alterações. Este *kit* tem na sua composição sais caotrópicos que desnaturam as proteínas e permitem a ligação do DNA à membrana de sílica. O isolamento de DNA plasmídico é composto por 6 passos:

1. Recolha da cultura celular;
2. Lise celular;
3. Ligação do plasmídeo à coluna de purificação;
4. Lavagem da coluna de purificação;
5. Lavagem e secagem da coluna de purificação;
6. Eluição do DNA plasmídico da coluna de purificação.

Isolou-se o DNA plasmídico de duas colónias individualizadas, que se denominou de “DNA plasmídico A” e “DNA plasmídico B”. O procedimento encontra-se detalhado no **Anexo 2**.

Por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X, foi possível avaliar a pureza do DNA plasmídico isolado. A preparação das amostras bem como as condições aplicadas na eletroforese encontram-se descritas no ponto 2.1. Utilizou-se o marcador de pesos moleculares *Lambda DNA/HindIII Marker* (Life Technologies). Finalmente, a concentração de DNA plasmídico isolado foi determinada com recurso ao equipamento *Nanodrop 1000* (Thermo Scientific). Este equipamento tem a vantagem de requer um pequeno volume de amostra (1 a 2 µL), além de que fornece informação sobre o grau de pureza do DNA isolado<sup>62</sup>.

### 2.3.2 Obtenção de células competentes

Obtiveram-se células competentes de *E. coli* XJb (DE3) pelo método de cloreto de cálcio<sup>63</sup>, com algumas alterações descritas seguidamente. Num passo inicial, preparou-se uma cultura celular de *E. coli* XJb (DE3) (Zymo Research) em meio LB com cloranfenicol a 34 µg/mL, que incubou *O.N.*, 37°C a 140 rpm. Findo este período, a cultura foi mantida em gelo durante 10 min, em seguida centrifugou-se à temperatura ambiente, durante 3 min a 5002 x g. O sedimento foi ressuscitado em 5 mL de uma solução gelada de CaCl<sub>2</sub> a 0,1 M e incubou no gelo por um período de 20 min. Centrifugou-se novamente nas condições acima referidas. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi

ressuspendido em 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  a 0,1 M com glicerol a 15%. Este volume foi distribuído por *eppendorfs* de 1,5 mL, cada um com 100  $\mu\text{L}$  de células competentes.

### 2.3.3 Transformação de *E. coli* XJb (DE3) com o vetor de expressão pLATE31

As células anteriormente tornadas competentes foram transformadas com o vetor de expressão pLATE31, que contém a sequência codificante para o antígeno rsm. Para a transformação, recorreu-se ao método de choque térmico, adaptado de *E. coli Calcium Chloride competent cell protocol*<sup>63</sup>.

A três *eppendorfs* que continham 100  $\mu\text{L}$  de solução de células XJb (DE3) competentes, adicionou-se 3  $\mu\text{L}$  de DNA plasmídico A. Selecionaram-se outros três *eppendorfs* com o mesmo volume de células competentes e adicionou-se 3  $\mu\text{L}$  de DNA plasmídico B. O sétimo *eppendorf* apenas continha 100  $\mu\text{L}$  de solução de células competentes e como tal serviu de controlo.

As células incubaram em contacto com o plasmídeo durante 30 min no gelo. O passo seguinte consistiu em realizar um choque térmico a 42°C, com diferentes tempos de incubação, num banho de água termostaticado (*BioShake iQ*). Um *eppendorf* com DNA plasmídico A e outro *eppendorf* com DNA plasmídico B sofreram um choque térmico de 1 min. Seguindo o mesmo esquema, o segundo conjunto de *eppendorfs* sofreu um choque térmico de 2 min, enquanto o terceiro conjunto de *eppendorfs* foi sujeito a um choque térmico de 4 min. O *eppendorf* de controlo foi submetido a um choque térmico de 1 min. Posteriormente, colocaram-se os *eppendorfs* em gelo e aí permaneceram por um período de 2 min. Adicionou-se 900  $\mu\text{L}$  de meio LB a cada *eppendorf* e deixou-se incubar durante 30 min, 37°C a 140 rpm. Seguiu-se uma centrifugação à temperatura ambiente, durante 2 min a 7000 x g. Descartou-se 800  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e o sedimento foi ressuspendido no restante volume presente no *eppendorf*.

As células transformadas foram inoculadas em placas de *Petri* com meio LB Agar com 100  $\mu\text{g/mL}$  de ampicilina, onde incubaram *O.N.* a 37°C. Após este período, contou-se o número de unidades formadoras de colónias (UFC) para os diferentes tempos de incubação. Isolaram-se 22 colónias transformadas das duas placas de *Petri* para o tempo de incubação de 2 min, e inoculou-se em duas placas de *Petri* com ampicilina a 100  $\mu\text{g/mL}$  de modo a se manter a viabilidade das mesmas. As placas de *Petri* incubaram *O.N.* a 37°C, verificando-se o aparecimento de colónias isoladas e posteriormente foram armazenadas a 4°C.

### 2.3.4 Confirmação da presença do antígeno em *E. coli* XJb (DE3)

Com o objectivo de confirmar a presença do plasmídeo de expressão para o antígeno nas células transformadas, realizaram-se três ensaios com:

- *E. coli* XJb (DE3) **com** o vetor de expressão e sem indução por IPTG;
- *E. coli* XJb (DE3) **com** o vetor de expressão e **com** indução por IPTG;
- *E. coli* XJb (DE3) sem o vetor de expressão e **com** indução por IPTG.

A partir das duas placas de *Petri* mencionadas no ponto **2.3.3**, inoculou-se uma colónia isolada escolhida aleatoriamente, em 5 mL de meio LB com ampicilina a 100 µg/mL, que se incubou *O.N.* a 37°C com agitação de 140 rpm. Após este período, retirou-se uma alíquota para eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15%. Induziu-se a expressão proteica pela adição de IPTG até uma concentração final de 1 mM e o meio incubou durante 3 h à temperatura de 37°C, com agitação de 140 rpm. No final desta incubação, retirou-se novamente uma alíquota para confirmar a presença do antígeno por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15%.

Inoculou-se em 5 mL de meio LB com cloranfenicol a 34 µg/mL, uma colónia isolada de *E. coli* XJb (DE3) sem o vetor de expressão pLATE31 com a sequência codificante para o antígeno, que incubou *O.N.* a 37°C com agitação de 140 rpm. No dia seguinte, adicionou-se IPTG até uma concentração de 1 mM e incubou-se durante 3 h a 37°C, com agitação de 140 rpm. Após este período, recolheu-se uma alíquota para eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15%.

## 2.4 Expressão, produção e purificação do antígeno em *E. coli* XJb (DE3)

Esta etapa consistiu na expressão, produção e purificação do antígeno, sendo que o ensaio foi realizado em duplicado. Uma colónia isolada foi inoculada em 5 mL de meio LB com ampicilina a 100 µg/mL, que incubou durante 3 h, a 37°C com agitação de 140 rpm. Findo este período, o pré-inoculo foi diluído em 50 mL de meio LB fresco com ampicilina a 100 µg/mL. Incubou-se a 37°C, com agitação de 140 rpm até atingir a absorvância pretendida, para posteriormente se induzir a expressão da proteína em estudo na presença de IPTG a 1 mM. De seguida incubou durante 4 h, a 37°C com agitação de 140 rpm e posteriormente a 4°C até ao dia seguinte.

No dia seguinte, o crescimento bacteriano foi centrifugado à temperatura ambiente, durante 15 min a 5002 x g. Seguidamente, o sedimento foi ressuscitado em 5 mL de meio LB fresco com ampicilina a 100 µg/mL, L-arabinose 1x (*Zymo Research*), cloranfenicol a 68 µg/mL e IPTG a 0,2 mM. O

meio foi incubado durante 2h, a 30°C com agitação de 140 rpm. Findo este período, as células foram centrifugadas à temperatura ambiente, durante 7 min a 3717 x g.

O trabalho prosseguiu com a lise celular por forma a libertar todo o material intracelular. O sedimento foi ressuspenso em 2,5 mL de tampão de lise (CHAPS 0,5%; EDTA 1 mM; KCl 50 mM; Tris 10 mM pH 8,0; Triton X-100 1%) juntamente com 10 µL de DNase I a 0,02 µg/mL, 5 µL de CaCl<sub>2</sub> a 2 mM e 5 µL de PMSF a 0,2 mM, tendo-se seguido um ciclo de congelação a -20°C e de descongelação à temperatura ambiente. Adicionou-se 1 mL de tampão de lise, homogeneizou-se a solução e repetiu-se o ciclo de congelação e de descongelação. De seguida, adicionou-se 1 mL de tampão de lise e centrifugou-se à temperatura ambiente, durante 10 min a 5002 x g. Por fim recolheu-se uma alíquota do sobrenadante e do sedimento para eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15%.

Pela análise do gel de SDS-PAGE a 15% verificou-se a presença do antígeno no sedimento. Por este motivo, o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de tampão de lise e armazenado a -20°C. No dia seguinte, após descongelar, centrifugou-se a amostra à temperatura ambiente durante 10 min a 5002 x g. O sedimento contendo o antígeno foi ressuspenso em 4 mL de ureia (*Sigma-Aldrich*) a 8M por forma a solubilizar os corpos de inclusão (IB, do inglês *Inclusion Bodies*). Os IB são agregados de proteínas que resultam da sobre-expressão de proteínas recombinantes em bactérias e podem ser ressolubilizados por agentes desnaturantes, como por exemplo a ureia<sup>64</sup>.

Seguidamente foi realizada uma centrifugação à temperatura ambiente, durante 10 min a 3717 x g. O sobrenadante contendo o antígeno foi purificado por cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC, do inglês *Immobilized Metal Affinity Chromatography*), utilizando uma resina de ião níquel (Ni<sup>2+</sup>) ideal para purificar proteínas recombinantes marcadas com histidina<sup>65</sup>. Para tal, uma coluna de cromatografia *HisTrap* de 1 mL (*GE Healthcare Life Sciences*) foi empacotada com 1 mL de resina *Ni Sepharose 6 Fast Flow* (*GE Healthcare Life Sciences*). O antígeno foi purificado de acordo com as recomendações do fabricante da resina, com algumas alterações.

Antes de se proceder à purificação, a coluna de cromatografia foi previamente equilibrada com 10 mL de tampão de lavagem (cloreto de sódio (NaCl; *Nzytech*) 500 mM; fosfato de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; *Merck*) 20 mM; imidazole (99%, *Sigma-Aldrich*) 20 mM; pH 7,4).

A 4 mL de amostra adicionou-se 5,4 mg de imidazole a 20 mM. A amostra foi aplicada lentamente na coluna. O volume eluído foi novamente aplicado na coluna para garantir que todo o antígeno se ligava à resina. A coluna foi novamente lavada com 10 mL de tampão de lavagem, sendo que o antígeno foi eluído da coluna com 5 mL de tampão de eluição (NaCl 500 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM; imidazole 500 mM; pH 7,4). Por último, lavou-se a coluna com 10 mL de tampão de lavagem. A

presença de NaCl nos tampões utilizados permite reduzir as interações eletrostáticas não específicas<sup>66</sup>. O volume eluído da coluna foi coletado em frações de 1 mL e guardado a 4°C.

Por ELISA foi possível confirmar a presença do antígeno no volume eluído com o tampão de eluição. Como o ensaio se realizou em duplicado obteve-se um volume final de 12 mL. Com o intuito de precipitar o antígeno, adicionou-se 24 mL de acetona (*José M. Vaz Pereira, S.A.*) e deixou-se incubar *O.N.* a 4°C. No dia seguinte, centrifugou-se a 4°C durante 5 min a 9383 x g (*Sigma 3K15*). Descartou-se o sobrenadante e deixou-se o sedimento secar à temperatura ambiente para evaporar vestígios de acetona. Uma vez seco, foi ressuscitado em 1,5 mL de tampão Tris-EDTA (TE; Tris 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0). Dialisou-se a amostra numa fita de diálise com porosidade 12400 MWCO (do inglês *Molecular Weight Cut Off*; D-0655, *Sigma*) contra tampão TE, *O.N.* a 4°C. Após este período, centrifugou-se à temperatura ambiente, durante 10 min a 9167 x g. Como se desconhecia em que fase estava o antígeno, guardou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuscitado em 500 µL de tampão TE. Ambos foram armazenados a 4°C. Por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15% foi possível confirmar a presença do antígeno e avaliar a sua pureza.

## 2.5 Otimização da expressão, produção e purificação do antígeno

Uma vez que se pretendia obter maior quantidade de antígeno, para posteriormente se proceder à formação dos bionanoconjugados em quantidade suficiente para os estudos de detecção foi necessário otimizar a expressão, produção e purificação do antígeno rsm.

Assim, inoculou-se uma colónia isolada em 5 mL de meio LB com ampicilina a 100 µg/mL, que incubou durante 3 h, a 37°C com agitação de 140 rpm. Findo este tempo, transferiu-se o primeiro pré-inóculo para 50 mL de meio LB fresco com ampicilina a 100 µg/mL. Deixou-se incubar *O.N.*, a 37°C com agitação de 140 rpm. No dia seguinte, o segundo pré-inóculo foi diluído em 600 mL de meio LB com o antibiótico acima referido. Incubou-se a 37°C com agitação de 140 rpm, até atingir a absorvância entre 0,6 e 1 a 600 nm. Quando o crescimento bacteriano atingiu a absorvância pretendida, foi induzido com IPTG a uma concentração final de 1 mM e deixou-se incubar durante 4 h, a 37°C com agitação de 140 rpm. Posteriormente, guardou-se *O.N.* a 4°C.

Após este período, o volume de 600 mL do crescimento induzido foi dividido igualmente por oito *falcons* de 50 mL. Centrifugou-se à temperatura ambiente, durante 15 min a 5002 x g. Descartaram-se os sobrenadantes e dividiu-se o restante volume pelos oito *falcons*. Centrifugou-se novamente nas condições acima referidas. Cada sedimento foi ressuscitado em 10 mL de meio LB fresco com ampicilina a 100 µg/mL, L-arabinose 1x, cloranfenicol a 68 µg/mL e IPTG a 0,2 mM, seguido

de um período de incubação de 2 h, a 30°C com agitação de 140 rpm. Centrifugou-se à temperatura ambiente, durante 15 min a 5002 x g.

Cada sedimento foi ressuscitado em 5 mL de tampão de lise juntamente com 20 µL de DNase I a 0,02 µg/mL, 10 µL de CaCl<sub>2</sub> a 2 mM e 10 µL de PMSF a 0,2 mM. Seguiu-se um ciclo de congelação e de descongelação. Adicionou-se 2 mL de tampão de lise, homogeneizaram-se as soluções e repetiu-se o ciclo de congelação e de descongelação. De seguida adicionou-se mais 1 mL de tampão de lise a cada solução, homogeneizou-se e centrifugou-se à temperatura ambiente, durante 15 min a 3717 x g. Uma alíquota de cada sobrenadante e de cada sedimento foi recolhida, para posteriormente se avaliar o resultado da lise celular e confirmar a presença do antígeno por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15%. Como o antígeno se encontrava maioritariamente no sedimento, este foi ressuscitado em 2 mL de tampão de lise e armazenado a -20°C, para posteriormente ser purificado. O procedimento de expressão e produção encontra-se esquematizado na **Figura 2.2**.

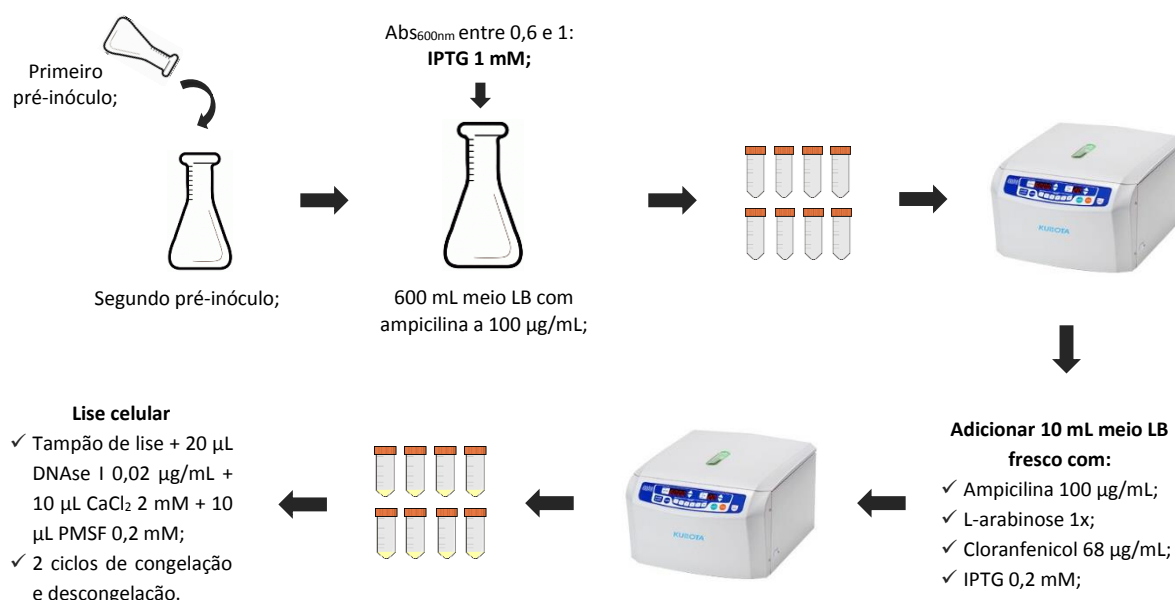


Figura 2.2 Representação esquemática da expressão e produção do antígeno, desde o crescimento até à lise celular.

Dada a dimensão da coluna de cromatografia (1 mL), optou-se por purificar os sedimentos individualmente para garantir o máximo rendimento entre cada purificação, isto é, para garantir que quando a amostra fosse aplicada na coluna, o antígeno se ligava à resina.

Cada sedimento foi centrifugado à temperatura ambiente, durante 15 min a 5002 x g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo o antígeno foi ressuscitado em 6 mL de ureia a 8 M, para solubilizar os IB. Centrifugou-se novamente à temperatura ambiente, durante 15 min a 3717 x g. Descartou-se o sedimento. Aos 6 mL do sobrenadante adicionou-se 8,2 mg de imidazole a 20 mM antes de se proceder à purificação.



Para o presente estudo, realizaram-se oito ensaios nos quais se experimentaram técnicas alternativas para purificar e concentrar o antígeno. O antígeno purificado no nono ensaio foi utilizado na conjugação com as nanopartículas de ouro. A **Quadro 2.3** sintetiza as técnicas aplicadas, enquanto os protocolos utilizados para cada ensaio se encontram descritos no **Anexo 3**.

Quadro 2.3 Resumo das diferentes técnicas utilizadas para purificar e concentrar o antígeno rsm.

Ensaio	Purificação do antígeno	Concentração do antígeno
<b>1º Ensaio - Purificação por IMAC seguido de PEG 8000</b>	IMAC com resina de ião <b>níquel</b> : - Tampão de lavagem (NaCl 500 mM; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM; imidazole 20 mM; pH 7,4); - Tampão de eluição (NaCl 500 mM; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM; imidazole 500 mM; pH 7,4);	Polietilenoglicol (PEG) 8000;
<b>2º Ensaio - Purificação por IMAC com gradiente descontínuo de imidazole, seguido de PEG 8000</b>	IMAC com resina de ião <b>níquel</b> por um gradiente descontínuo de soluções de imidazole a 20, 100, 200 e 500 mM;	PEG 8000;
<b>3º Ensaio - Choque térmico seguido de purificação por IMAC e PEG 8000</b>	Choque térmico a 100°C durante 10 min, seguido de IMAC com resina de ião <b>níquel</b> por um gradiente descontínuo de soluções de imidazole a 20, 100 e 500 mM;	PEG 8000;
<b>4º Ensaio - Purificação por IMAC seguido de PEG 8000 e ultraconcentração Amicon</b>	IMAC com resina de ião <b>níquel</b> : - Tampão de lavagem (NaCl 500 mM; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM; imidazole 20 mM; pH 7,4); - Tampão de eluição (NaCl 500 mM; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM; imidazole 500 mM; pH 7,4);	PEG 8000 seguido de Amicon;
<b>5º Ensaio - Purificação por IMAC seguido de ultraconcentração Amicon</b>	IMAC com resina de ião <b>níquel</b> : - Tampão de lavagem (NaCl 500 mM; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM; imidazole 20 mM; pH 7,4); - Tampão de eluição (NaCl 500 mM; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM; imidazole 500 mM; pH 7,4);	Amicon seguido de PEG 8000;
<b>6º Ensaio - Purificação por IMAC com quatro iões metálicos diferentes</b>	IMAC com diferentes iões metálicos ( <b>cobre, zinco, cobalto e níquel</b> ): - Tampão de lavagem (NaCl 500 mM; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM; imidazole 20 mM; pH 7,4); - Tampão de eluição (NaCl 500 mM; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM; imidazole 500 mM; pH 7,4);	PEG 8000;
<b>7º Ensaio - Purificação por IMAC de ião cobre com gradiente descontínuo de imidazole</b>	IMAC com resina de ião <b>cobre</b> por um gradiente descontínuo de soluções de imidazole a 20, 100, 200 e 500 mM;	-
<b>8º Ensaio - Purificação por IMAC de ião cobre e posteriormente por cromatografia de troca iônica</b>	IMAC com resina de ião <b>cobre</b> : - Tampão de lavagem (NaCl 500 mM; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM; imidazole 20 mM; pH 7,4);	PEG 8000;

	- Tampão de eluição (NaCl 500 mM; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM; imidazole 500 mM; pH 7,4); Seguindo-se cromatografia de troca iónica com <b>resina aniónica</b> : - Tampão de lavagem (imidazole 20 mM, pH 9,0). - Tampão de eluição (imidazole 20 mM, NaCl 1M, pH 9,0);	
<b>9º Ensaio - Antígeno purificado por IMAC para posteriormente se conjugar com AuNP</b>	IMAC com resina de ião <b>cobre</b> : - Tampão de lavagem (NaCl 500 mM; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM; imidazole 20 mM; pH 7,4); - Tampão de eluição (NaCl 500 mM; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM; imidazole 500 mM; pH 7,4).	-

## 2.6 Síntese de nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro (AuNP) foram sintetizadas pelo método de *Turkevich*<sup>31</sup> e posteriormente desenvolvido por *Kimling*<sup>32</sup>, sujeito a algumas alterações<sup>67</sup>. Este método baseia-se na redução de ácido tetracloroáurico na presença de citrato de sódio, que atua não só como agente redutor mas também como agente de revestimento (*capping agent*), proporcionando estabilização eletrostática às AuNP em solução<sup>68</sup>.

Antes de se iniciar a síntese, todo o material de vidro usado foi previamente imerso em água-régia (ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>; *Panreac*) + ácido clorídrico (HCl; *Panreac*) 1:3 v/v), *O.N.*, e no dia seguinte lavado com água ultrapura *Milli-Q*. A água-régia permite eliminar possíveis vestígios de metais que se encontrem depositados no material de vidro, podendo estes interferir com a síntese das AuNP.

Resumidamente, num balão de fundo redondo de 500 mL, adicionou-se 100 mL de água ultrapura *Milli-Q* e 69,2 µL de ácido tetracloroáurico (*Au(III)* 30% wt in HCl; 99,9%; *Sigma-Aldrich*) a 1,45 mM. Um condensador foi adaptado ao balão e a solução foi aquecida sob refluxo numa placa de aquecimento (*P Selecta*), sob agitação moderada. Uma vez em ebulição, adicionou-se 10 mL de citrato de sódio a 38,8 mM (99%; *Sigma-Aldrich*) e manteve-se a solução sob aquecimento e agitação durante 15 minutos. Após este período, manteve-se a solução apenas sob agitação durante 15 min. Arrefeceu à temperatura ambiente e a solução de AuNP foi caracterizada por espectroscopia de UV-vis. Armazenou-se a 4°C ao abrigo da luz para posteriores utilizações. As mudanças de cor observadas no decorrer da síntese de AuNP encontram-se representadas na **Figura 2.3**. As AuNP sintetizadas apresentam o máximo da banda de LSPR a cerca de 520 nm, característico de formas esféricas entre 10 a 20 nm de diâmetro<sup>23</sup>.

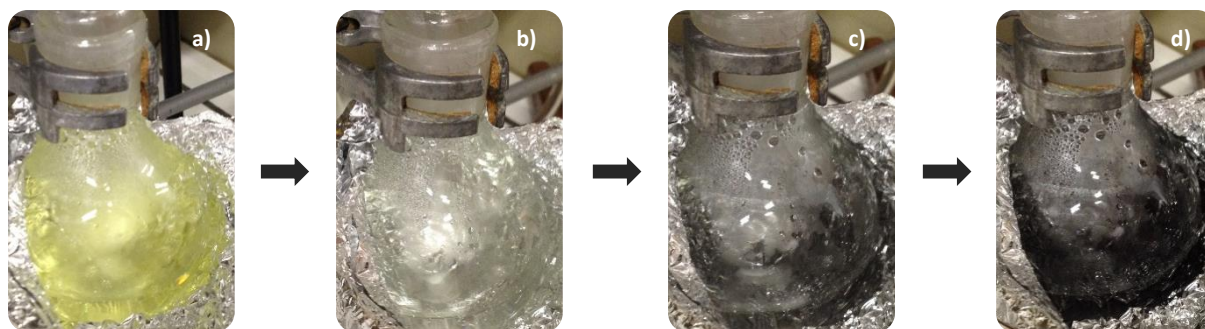


Figura 2.3 a) A solução de Au(III) de cor amarela b) torna-se incolor após adição de citrato de sódio. Segundos depois, c) a solução adquire cor azul/preta e por fim d) cor vermelha, indicativa de uma solução coloidal de nanopartículas de ouro esféricas.

### 2.6.1 Caracterização das nanopartículas de ouro

O tamanho e a concentração das nanopartículas de ouro foi determinado pelo método de *Haiss et al.*<sup>69</sup>, por espectroscopia de UV-vis.

Este método relaciona o valor de absorvância máxima da banda de LSPR ( $Abs_{LSPR}$ ) com o valor de absorvância para o comprimento de onda de 450 nm ( $Abs_{450nm}$ ) (**Equação 2.1**).

$$y = \frac{Abs_{LSPR}}{Abs_{450nm}} \quad \text{Equação 2.1}$$

Substituindo o valor de y na **Equação 2.2** foi possível estimar o diâmetro das AuNP, ao qual corresponde um coeficiente de extinção molar para o comprimento de onda de 450 nm ( $\epsilon_{450nm}$  em  $M^{-1}.cm^{-1}$ ) específico e tabelado<sup>70</sup>.

$$y = 0,335 \ln x + 0,7301 \quad \text{Equação 2.2}$$

Por último, pela lei de *Lambert-Beer* (**Equação 2.3**) determinou-se a concentração (c em M) das AuNP.

$$c = \frac{Abs_{450nm}}{\epsilon_{450nm} \times b} \quad \text{Equação 2.3}$$

Os espectros de UV-vis foram obtidos num espectrofotómetro (*Cary*, modelo 50 versão 3.0), num intervalo de comprimento de onda de 300 a 900 nm, com recurso a células de quartzo (*Hellma Analytics*) com o comprimento do percurso óptico (b) de 1 cm.

## 2.7 Funcionalização de nanopartículas de ouro

As nanopartículas revestidas por citrato de sódio foram funcionalizadas com o ácido mercaptoundecanóico (MUA) ou com o pentapéptido CALNN com o intuito de aumentar a estabilidade coloidal, bem como proporcionar superfícies mais convenientes para a conjugação do antígeno com as AuNP<sup>36,40</sup>.

### 2.7.1 AuNP-MUA

A um volume determinado de solução de AuNP a 5,19 nM adicionou-se uma solução de MUA a 10 mM em etanol absoluto, de modo a obter uma razão molar final de AuNP:MUA de 1:5000. Deixou-se incubar durante 2 h, à temperatura ambiente.

### 2.7.2 AuNP-CALNN

Para a funcionalização com o pentapéptido CALNN, a um volume determinado de solução de AuNP a 5,19 nM, adicionou-se um volume de solução de CALNN a 4,68 mM, para obter uma razão molar de AuNP:CALNN de 1:1000. Esta mistura incubou *O.N.* à temperatura ambiente.

A funcionalização das AuNP por estes agentes de revestimento foi comprovada por espectroscopia de UV-vis.

## 2.8 Formação de bionanoconjugados

Para a preparação dos bionanoconjugados utilizou-se uma concentração *stock* de antígeno recombinante sintético multiepítipo a 13,11 mg/mL.

### 2.8.1 AuNP-MUA-Antígeno

Para a formação dos bionanoconjugados AuNP-MUA-Antígeno, com ligação eletrostática entre o antígeno e as AuNP funcionalizadas, uma solução de AuNP previamente funcionalizada com MUA foi distribuída em volumes de 1,5 mL. As AuNP-MUA foram incubadas com diferentes razões molares de antígeno, desde 0 a 1200, *O.N.* a 4°C. Após a conjugação, o excesso de antígeno foi removido por

centrifugação a 4°C, durante 10 min a 6260 x g (*Centurion Scientific K3 Series*, rotor BRK5424). As amostras para as razões molares de 0, 100 e 200 foram novamente centrifugadas a 4°C, durante 5 min a 19173 x g. Cada sedimento foi ressuspensionado em 13,5 µL de tampão fosfato de sódio (*Sigma-Aldrich*) pH 7,2 a 5 mM e 1,5 µL de glicerol (99,5%, *Sigma-Aldrich*). Os bionanoconjugados foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 0,3%.

### 2.8.2 AuNP-MUA-EDC/NHS-Antigénio

Para obtenção dos bionanoconjugados AuNP-MUA-Antigénio, com reticulação química do antigénio à AuNP funcionalizada, distribuiu-se igualmente uma solução de AuNP-MUA em volumes de 1,5 mL, ao qual se adicionou EDC a 0,667 mM (*Sigma-Aldrich*) e NHS a 1,33 mM (*Fluka*) que incubou durante 1 h a 4°C. Posteriormente, adicionaram-se diferentes razões molares de antigénio, desde 0 a 1300, e deixou-se incubar *O.N.* a 4°C. Após a conjugação, centrifugou-se a 4°C durante 5 min a 6260 x g. As amostras para as razões molares de 0, 100 e 200 foram novamente centrifugadas a 4°C, durante 5 min a 19173 x g. Removeu-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspensionado em 13,5 µL de tampão fosfato de sódio pH 7,2 a 5 mM e 1,5 µL de glicerol. A formação dos bionanoconjugados foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 0,3%.

### 2.8.3 AuNP-CALNN-Antigénio

Para a formação dos bionanoconjugados AuNP-CALNN-Antigénio, com ligação eletrostática entre o antigénio e as AuNP funcionalizadas, adicionou-se antigénio com diferentes razões molares, de 0 a 1500, a uma solução de AuNP-CALNN previamente distribuída em volumes de 1,5 mL. Os bionanoconjugados incubaram *O.N.* a 4°C. Após este período, centrifugou-se a 4°C, durante 10 min a 19173 x g. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspensionado em 13,5 µL de tampão fosfato de sódio pH 7,2 a 5 mM e 1,5 µL de glicerol. Por eletroforese em gel de agarose a 0,3% verificou-se a formação dos bionanoconjugados.

## 2.9 Estabilidade coloidal das nanopartículas de ouro e dos bionanoconjugados

A estabilidade coloidal das nanopartículas de ouro funcionalizadas e dos bionanoconjugados foi estudada pela variação da força iónica e do pH do meio envolvente, mantendo a concentração de

AuNP constante. Os ensaios foram realizados em duplicado para quatro soluções distintas: nanopartículas funcionalizadas com citrato (AuNP-citrato), nanopartículas funcionalizadas com MUA (AuNP-MUA), nanopartículas funcionalizadas com CALNN (AuNP-CALNN) e nanopartículas funcionalizadas com MUA e revestidas com antigénio (AuNP-MUA-Antigénio). A concentração de AuNP funcionalizadas com citrato, MUA e CALNN foi de 1 nM, enquanto a concentração para AuNP-MUA-Antigénio foi de 5,19 nM.

### 2.9.1 Variação da força iónica

Pela adição de diferentes volumes de solução de NaCl (*Scharlau*) a 5 M, foi possível variar a força iónica entre 0 e 1 M do meio envolvente. O efeito da variação da força iónica foi acompanhado por espectroscopia de UV-vis.

### 2.9.2 Variação do pH do meio

A adição de uma solução de ácido forte ou base forte permitiu variar o pH final da solução. Mantendo a concentração de AuNP constante, variou-se o valor de pH entre 2 e 10 pela adição de HCl a 0,1 M ou de hidróxido de sódio (NaOH; *Fluka*) a 0,1 M. Os valores de pH foram medidos com recurso a um elétrico de pH (*Crison, pH meter basic 20+*). Sempre que o valor de pH foi ajustado para o valor pretendido, aguardou-se 2 minutos antes de se medir a absorvância para comprimentos de onda entre 300 e 900 nm.

## 2.10 Técnicas gerais

### 2.10.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Numa microplaca de ELISA com 96 poços, transparente de fundo raso (*Greiner*), adicionou-se 50 µL de cada fração resultante da purificação, em duplicado. Deixou-se incubar a 37°C durante 1 h. Seguidamente lavou-se a microplaca, uma única vez, com tampão fosfato salino 1x (PBS, do inglês *Phosphate-Buffered Saline*; NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; dihidrogeno fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; *Merck*) 1,8 mM; pH 7,4). Seguiu-se o bloqueio dos poços com 65 µL de polivinil álcool (PVA; *Aldrich*) a 1% que incubou durante 15 min à temperatura ambiente. Verteu-se a microplaca de ELISA para remover a solução de bloqueio.

Posteriormente, adicionou-se 50 µL de anticorpo primário diluído de 1:400 em PBS 1X com gelatina (*Bio-Rad*) a 0,1%. Trata-se de um anticorpo policlonal anti-*P. jirovecii* produzido *in house* pela imunização de murganhos Balb/C – com o antígeno rsm obtido em<sup>16</sup>, isolado a partir de um gel de SDS-PAGE a 15%, no qual se excisou a banda correspondente ao antígeno e se injetou juntamente com adjuvante incompleto de *Freud* (*Sigma*). Deixou-se incubar a 37°C, durante 20 min. Verteu-se a microplaca para remover o excesso de anticorpo primário não ligado. Posteriormente, adicionou-se 50 µL de anticorpo secundário, uma IgM anti-rato conjugada com a enzima fosfatase alcalina e produzida em cabra (A-7784; *Sigma Immuno Chemicals*) diluído de 1:1000 em PBS-Tween (PBS 1X; Tween 20 (*Merck-Schuchardt*) 0,05%). Incubou a 37°C, durante 15 min. Após este período, a microplaca foi lavada três vezes com PBS-Tween e uma quarta vez com água da torneira para remover o excesso de anticorpo secundário não ligado.

Por último, adicionou-se 50 µL de substrato 4-nitrofenilfosfato dissódico (*AppliChem*) diluído a 1mg/mL em tampão substrato (dietanolamina (*Sigma-Aldrich*) 10 mM; MgCl<sub>2</sub> (*Sigma-Aldrich*) 0,5 mM; pH 9,8). Deixou-se incubar a 37°C durante 1 h. O resultado do ensaio foi determinado pela leitura da absorvância para o comprimento de onda de 405 nm, num leitor de microplacas (*Infinite 200 Pro*, *Tecan*). A observação de cor amarela permitiu inferir a presença do antígeno. A **Figura 2.4** representa os passos necessários para detetar o antígeno rsm por ELISA.

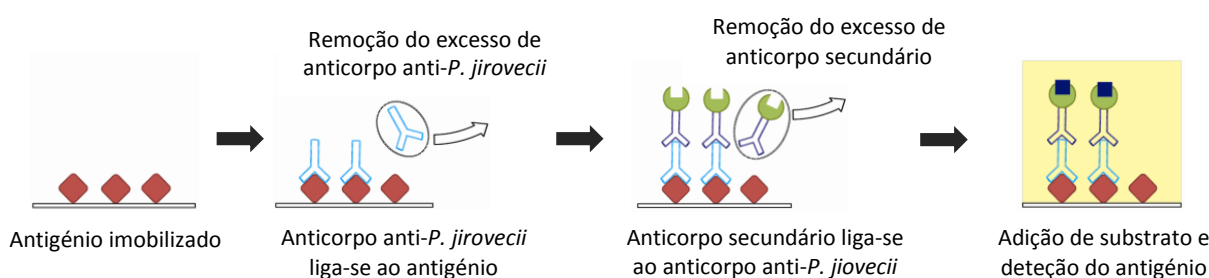


Figura 2.4 Representação esquemática da técnica de ELISA para a detecção de antígeno. O anticorpo anti-*P. jirovecii* liga-se especificamente ao antígeno imobilizado. Um anticorpo secundário, conjugado com uma enzima, liga-se ao anticorpo primário. Na presença do substrato produz-se um sinal visível que permite inferir a presença do antígeno. Adaptado de <sup>71</sup>.

### 2.10.2 Eletroforese em gel de agarose a 0,3%

A formação dos bionanoconjugados foi confirmada pela separação por eletroforese em gel de agarose (*UltraPure Agarose*, *Invitrogen*) a 0,3% em tampão TAE 0,125X. Depois de preparado (0,13 g em 45 mL de tampão TAE 0,125X), o gel foi imerso no tampão acima referido e aplicou-se 15 µL de amostra por poço. A separação eletroforética foi efetuada durante 20 min a 100 volts, recorrendo aos equipamentos *ENDURO 7.7 Horizontal Gel Box* (*Labnet*) e *PowerPac Basic Power Supply* (*Bio-Rad*).

A mobilidade eletroforética ( $\mu$  em  $\text{cm}^2/\text{Vs}$ ) foi determinada pela medida da distância de migração (cm) e de acordo com a **Equação 2.4**<sup>52,57</sup>. Para esta equação  $v$  representa a velocidade de migração (cm/s) e  $E$  o campo elétrico (V/cm).

$$\mu = \frac{v}{E} \quad \text{Equação 2.4}$$

### 2.10.3 Eletroforese em gel de SDS-PAGE

Por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15% foi possível analisar a pureza do antígeno, recorrendo aos equipamentos *Mini-Protean II Tube Cell* (Bio-Rad) e *EC4000P Series 90 Programmable* (*Apparatus Corporation*). Os géis são constituídos por acrilamida/bis-acrilamida numa proporção de 37,5:1, tendo sido preparados conforme descrito no **Quadro A.3** (ver **Anexo 4**).

A 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra a analisar adicionou-se 20  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra (azul bromofenol (*Sigma* B-6131) 1 % (p/v); glicerol (87%; *Merck*) 10% (v/v); 2-mercaptoetanol (*Merck*) 715 mM; SDS 10% (p/v); Tris-HCl 0,5 M; pH 6,8). As misturas foram homogeneizadas e aquecidas a 100 °C, durante 10 minutos. De seguida, centrifugou-se à temperatura ambiente, durante 8 minutos a 16700 x g e aplicou-se 10  $\mu\text{L}$  de amostra por poço e 7,5  $\mu\text{L}$  de marcador de peso molecular (*Roti - Mark Standard*, *Carl Roth*) a outro poço. Os géis foram mergulhados em tampão de corrida (glicina (*Sigma-Aldrich*) 1,92 M; SDS 1% (v/v); Tris 250 mM) e aplicou-se uma corrente de 200 V, durante 45 minutos.

Quando finalizada a corrida, os géis foram corados numa solução corante (ácido acético 10% (v/v); azul *coomassie* R-250 (*Sigma*) 2%; etanol (*Panreac*) 47,5% (v/v)) ou em alternativa os géis foram corados com a solução *BlueSafe* (*Nzytech*), ambas *O.N.* Os géis corados na solução corante foram descorados numa solução descorante (solução aquosa de etanol a 50%) que atuou por 30 minutos. Os resultados foram registados com uma máquina fotográfica digital (*PowerShot A710 IS*, *Canon*).

### 2.10.4 Método do Ácido Bicinconínico

Para determinar a concentração do antígeno rsm recorreu-se ao método do ácido bicinconínico (BCA, do inglês *Bicinconinic Acid Assay*), realizado de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante *Sigma-Aldrich*<sup>72</sup>.

A 50 partes da solução A (*Bicinchoninic Acid solution*, *Sigma*) adicionou-se 1 parte de solução B (*Copper (II) Sulfate solution 4%*, *Sigma*). A mistura A+B foi distribuída em alíquotas de 1 mL. Sete dessas alíquotas foram utilizadas para construir a reta de calibração, no qual se adicionaram volumes entre 0



e 24 µL de albumina de soro bovino (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumin*; *Sigma-Aldrich*) a 1 mg/mL. Para determinar a concentração de antígeno, adicionou-se 10 µL e 20 µL de cada amostra, em duplicado. Seguiu-se um período de incubação de 30 min a 37 °C, tendo-se de seguida medido a absorvância para o comprimento de onda de 562 nm, num espectrofotómetro UV-vis (*Cary*, modelo 50 versão 3.0). Através da reta de calibração foi possível calcular a concentração de antígeno em cada amostra (ver **Anexo 5**).

**Página em Branco**

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Confirmação da presença da sequência codificante para o antígeno em pLATE31, presente em *E. coli* BL21 Star (DE3)

A sequência codificante do antígeno rsm foi anteriormente inserida no vetor de expressão pLATE31 em *E. coli* BL21 Star (DE3), tal como descrito em<sup>16</sup>.

Assim, foi necessário confirmar a presença da sequência do antígeno nas dez colónias selecionadas aleatoriamente por PCR de colónia<sup>58</sup>, utilizando *primers* específicos capazes de amplificar a sequência pretendida. Os resultados foram monitorizados através de um controlo negativo que continha água desionizada estéril, e um controlo positivo que continha o vetor de clonagem pUC57-Amp<sup>16</sup> no qual se tinha inserido anteriormente a sequência codificante para o antígeno rsm. Após PCR de colónia, os resultados obtidos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1%, (**Figura 3.1**).

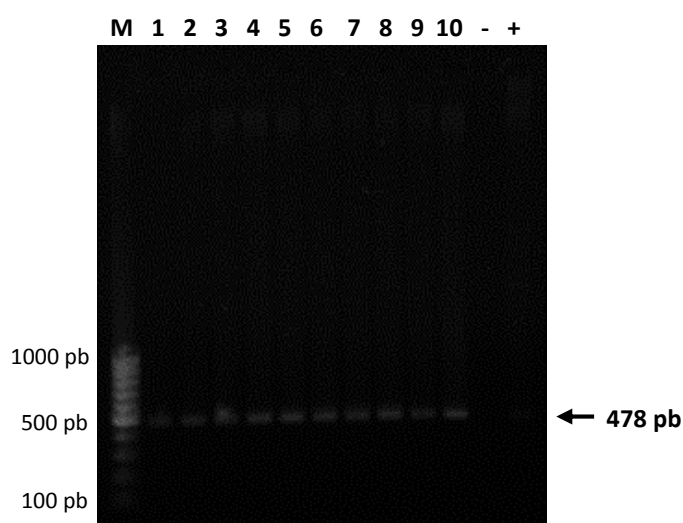


Figura 3.1 Gel de agarose a 1% para as 10 colónias isoladas (1 a 10). Representação do marcador de peso molecular 100 pb (M), do controlo negativo (-) e controlo positivo (+).

De acordo com a **Figura 3.1**, para o controlo positivo verifica-se a presença de uma banda com o tamanho de 478 pb, correspondente ao vetor de clonagem pUC57-Amp no qual a Mestre Ana Tomás<sup>16</sup> tinha inserido anteriormente a sequência codificante para o antígeno rsm. Para as dez colónias selecionadas também é observável a presença de bandas com o tamanho de 478 pb, correspondentes à sequência codificante para o antígeno inserida no vetor de expressão pLATE31. Estes resultados estão de acordo com resultados anteriores<sup>16</sup>, o que revela que as colónias selecionadas contêm a sequência codificante para a proteína em estudo. Para o controlo negativo não

houve amplificação, o que permite validar os resultados obtidos. O trabalho prosseguiu com a expressão e produção do antígeno recombinante.

### 3.2 Expressão e produção do antígeno em *E. coli* BL21 Star (DE3)

A expressão e produção do antígeno foi adaptada de<sup>59</sup>, onde *E. coli* BL21 Star (DE3) incubou a 37°C para que as bactérias se multiplicassem exponencialmente. O crescimento celular foi monitorizado pela leitura da absorvância a 600 nm, entre 0,6 e 1, com o intuito de garantir que as bactérias se encontravam na fase exponencial<sup>60</sup> para posteriormente se induzir a expressão do antígeno. A adição de cloranfenicol teve por objectivo solubilizar os corpos de inclusão<sup>73,74</sup>. De facto, após indução pelo IPTG a estirpe bacteriana BL21 tende a formar IB com relativa facilidade. Por este motivo, os IB podem ser solubilizados se a síntese proteica for inibida pelo uso de cloranfenicol em elevada concentração.

O trabalho prosseguiu com a lise celular adaptada de<sup>61</sup>. As células foram concentradas por centrifugação e ressuspensas em tampão de lisozima que tem na sua composição uma mistura de detergentes que facilitam a lise, enquanto a enzima lisozima hidrolisa a ligação glicosídica do peptidoglicano, que constitui a parede celular das bactérias<sup>75</sup>. A lise celular foi suplementada com um ciclo de congelação e de descongelação, o que faz com que as células se contraíam (congelação), aumentem de volume (descongelação) e por conseguinte se rompam devido à formação de cristais de gelo<sup>76</sup>. A adição de tampão de DNase I permite que a enzima DNase I clive o DNA genómico das bactérias e consequentemente reduza a viscosidade do lisado<sup>61</sup>. A centrifugação permitiu separar a fração insolúvel (sedimento) da fração solúvel (sobrenadante). Seguidamente estas frações foram analisadas por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15%, tal como ilustrado na **Figura 3.2**, sendo que o ensaio foi realizado em duplicado,

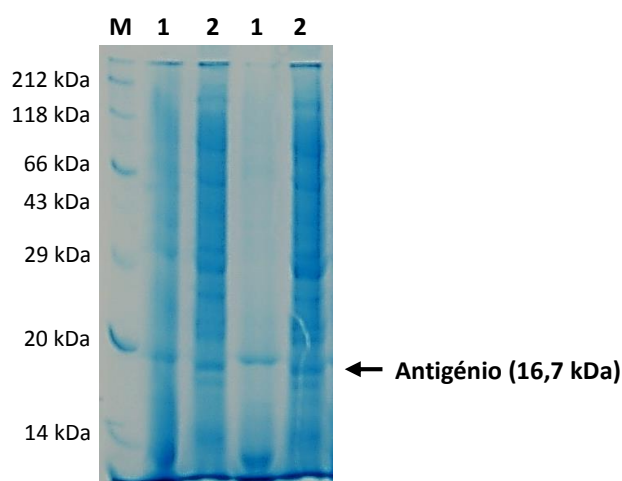


Figura 3.2 Gel de SDS-PAGE a 15% após a lise celular de *E. coli* BL21 Star (DE3). M - Marcador de pesos moleculares; 1 - Sedimento; 2 - Sobrenadante.

Em ambos os sobrenadantes é possível constatar a presença do antígeno, uma vez que se observam bandas com o peso molecular de 16,7 kDa. Para complementar este ensaio dever-se-ia ter utilizado um controlo, por exemplo *E. coli* BL21 Star (DE3) sem o vetor de expressão pLATE31 com indução por IPTG, pois seria expectável que após a indução não se observasse uma banda com o peso molecular de 16,7 kDa, correspondente ao antígeno. Como a bactéria não contém o vetor de expressão pLATE31 com a sequência codificante para o antígeno, a adição de IPTG apenas induziria a expressão de proteínas intrínsecas à bactéria. Todavia, estes resultados estão de acordo com os estudos realizados anteriormente em<sup>16</sup>, o que permite confirmar a presença do antígeno em ambos os sobrenadantes. Após a lise celular, verifica-se que os sobrenadantes apresentam maior conteúdo em proteínas comparativamente aos sedimentos, o que indica que as proteínas foram maioritariamente solubilizadas.

### 3.3 Clonagem do vetor pLATE31 em *E. coli* XJb (DE3)

Como se pretendia obter maior quantidade de antígeno, com vista à formação dos bionanoconjugados AuNP-Antígeno, optou-se por clonar o vetor de expressão pLATE31 com a sequência correspondente ao antígeno em *E. coli* XJb (DE3). Esta estirpe bacteriana foi geneticamente modificada pela inserção do gene  $\lambda$  R na posição do gene araB. Assim, o fenótipo de autólise é induzido pelo promotor P<sub>BAD</sub> na presença de arabinose, um açúcar não metabolizável. Após indução do bacteriófago  $\lambda$  R endolisina, a bactéria permanece intacta mas é lisada eficientemente após um ciclo de congelação e de descongelação, não necessitando da enzima lisozima nem de outros métodos de ruptura física, como ultrasonicação, *french press* ou *beadbeater*<sup>77</sup>. Enquanto para a lise celular de *E. coli* BL21 Star (DE3) tinha o inconveniente de usar a enzima lisozima. Por vezes as preparações comerciais de lisozima contêm outras enzimas que podem prematuramente lisar as células, ou degradar as proteínas ou os ácidos nucleicos<sup>77</sup>. Além de que, a lisozima tem um peso molecular (14,3 kDa)<sup>52</sup> muito próximo do peso molecular do antígeno (16,7 kDa), o que poderia interferir na expressão e/ou purificação do antígeno rsm.

Desta forma foi necessário isolar o DNA plasmídico de duas colónias de *E. coli* BL21 Star (DE3), com recurso ao kit *illustra plasmidPrep Mini Spin Kit*. A pureza do DNA plasmídico isolado foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1% (**Figura 3.3**).

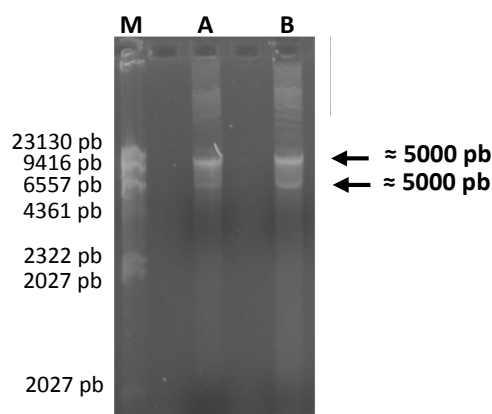


Figura 3.3 Gel de agarose a 1% para o DNA plasmídico isolado. M - Marcador de peso molecular; A - DNA plasmídico A; B - DNA plasmídico B.

De acordo com a **Figura 3.3**, é possível constatar que tanto o DNA plasmídico A como o DNA plasmídico B apresentam duas isoformas. Possivelmente quando se isolou o plasmídeo da cultura bacteriana, este apresentava-se em duas isoformas e como tal, cada isoforma irá migrar de modo distinto no gel de agarose. Se o plasmídeo tivesse sido cortado por uma enzima de restrição, as diferentes isoformas linearizavam e apenas seria visível a presença de uma banda com o peso molecular aproximado a 5000 pb. Deste modo, cada isoforma visível na **Figura 3.3** tem o peso molecular aproximadamente igual a 5000 pb, correspondente ao vetor pLATE31 ( $\approx 4,5$  kb) e à sequência codificante para o antigénio rsm (438 pb). A concentração do DNA plasmídico isolado foi determinada com recurso ao equipamento *Nanodrop 1000*, como representado no **Quadro 3.1**.

Quadro 3.1 Concentração (ng/ $\mu$ L) do DNA plasmídico A e DNA plasmídico B.

Concentração (ng/ $\mu$ L)	
DNA plasmídico A	8,5
DNA plasmídico B	31,2

Como patente no **Quadro 3.1**, a concentração do DNA plasmídico B (31,2 ng/ $\mu$ L) é cerca de quatro vezes superior à concentração do DNA plasmídico A (8,5 ng/ $\mu$ L). Esta diferença de concentrações pode ser justificada pelo facto de não se ter aplicado o quarto passo no isolamento do DNA plasmídico B (ver **Anexo 2**). Este passo tem por objetivo eliminar restos celulares resultantes da lise das bactérias. Possivelmente o DNA plasmídico estava ligado a algumas proteínas e como tal, quando se lavou a coluna de purificação com o tampão de lise tipo 9, o DNA plasmídico pode ter sido eluído em conjunto com as proteínas, o que explica a menor concentração de DNA plasmídico A.

Depois de isolado o DNA plasmídico, as células de *E. coli* *XJb* (*DE3*) foram tornadas competentes pelo método de cloreto de cálcio<sup>63</sup> e transformadas pelo método do choque térmico a

42°C<sup>63</sup>. A adição de uma solução de CaCl<sub>2</sub> gelada a uma suspensão de células promove a ligação do DNA aos lipopolissacarídeos (LPS, do inglês *Lipopolysaccharide*), moléculas recetores presentes à superfície das células competentes. Isto é, o íon divalente cálcio forma um complexo de coordenação com as duas moléculas carregadas negativamente – o DNA e os LPS<sup>78</sup>. Enquanto o choque térmico aumenta a fluidez da membrana ajudando a internalização do DNA para o interior das células. Assim, as células competentes estiveram em contacto com o DNA plasmídico por um longo período de tempo, no gelo, para promover a ligação do DNA aos LPS. Para otimizar a eficiência da transformação, realizou-se um choque térmico 42°C com diferentes tempos de incubação, nomeadamente 1, 2 e 4 min. As células transformadas foram inoculadas em meio LB Agar com ampicilina e determinou-se o número de UFC, pela contagem de colónias isoladas (**Figura 3.4**). Para monitorizar os resultados realizou-se um controlo somente com células competentes.

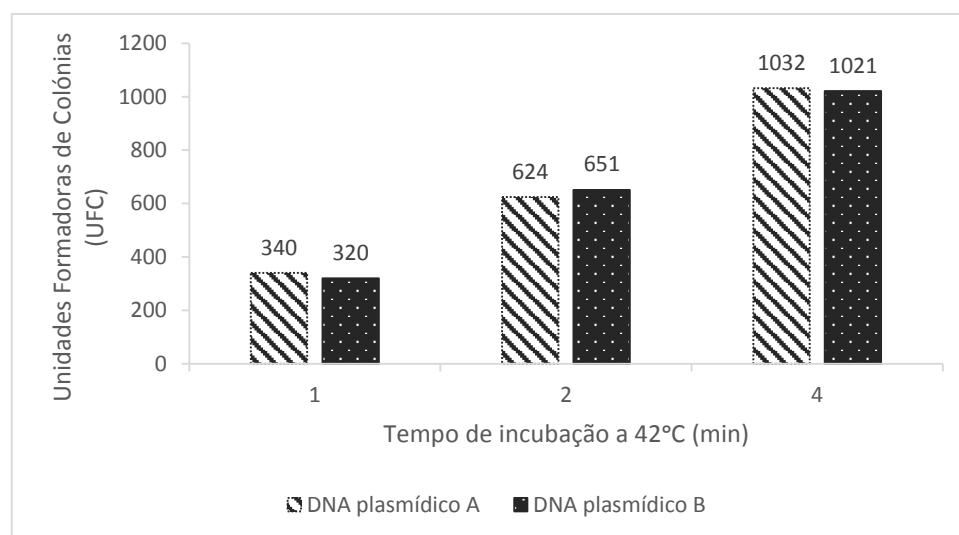


Figura 3.4 Número de UFC em função dos diferentes tempos de incubação (1, 2 e 4 min) para o choque térmico a 42°C.

Para os três tempos de incubação não se observam diferenças significativas entre o número de UFC para as células transformadas com DNA plasmídico A ou B, o que revela que as diferentes concentrações de DNA plasmídico (**Quadro 3.1**) não afetaram a eficiência da transformação das células de *E. coli XJb (DE3)*. De entre os três tempos em estudo, verifica-se que para o tempo de incubação de 1 min se obteve um menor número de UFC (340 e 320), o que indica que as células refrigeradas não atingiram imediatamente a temperatura de 42°C, havendo a necessidade de aumentar o tempo de incubação. Quando o tempo de incubação duplica (2 min), observa-se um aumento do número de UFC (624 e 651) comparativamente ao número de UFC para o tempo de incubação de 1 min. Com o aumento do tempo de incubação para 4 min, é possível constatar o aumento do número de UFC (1032 e 1021) comparativamente ao número de UFC para os tempos de 1 e 2 min. Analisando os três tempos

de incubação verifica-se que à medida que o tempo de incubação aumenta, o número de UFC também aumenta.

A partir das placas de *Petri* para o tempo de 2 min, isolaram-se 22 colónias transformadas para manter a viabilidade das mesmas. Para este tempo de incubação, como as colónias se encontram mais afastadas entre si é possível garantir que se isolam colónias únicas. A ausência de crescimento na placa controlo validou os resultados obtidos, visto que as bactérias competentes sem o vetor de expressão pLATE31 são incapazes de crescer na presença de ampicilina pois não apresentam resistência a este antibiótico.

Terminado o processo de transformação, interessava confirmar a presença do plasmídeo de expressão para o antígeno na nova estirpe bacteriana. Para tal realizaram-se três ensaios: *E. coli XJb (DE3)* com o vetor de expressão, mas sem indução por IPTG; *E. coli XJb (DE3)* com o vetor de expressão e com indução por IPTG e *E. coli XJb (DE3)* sem o vetor de expressão e com indução por IPTG. O resultado dos ensaios foi determinado por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15%, como se apresenta na **Figura 3.5**.

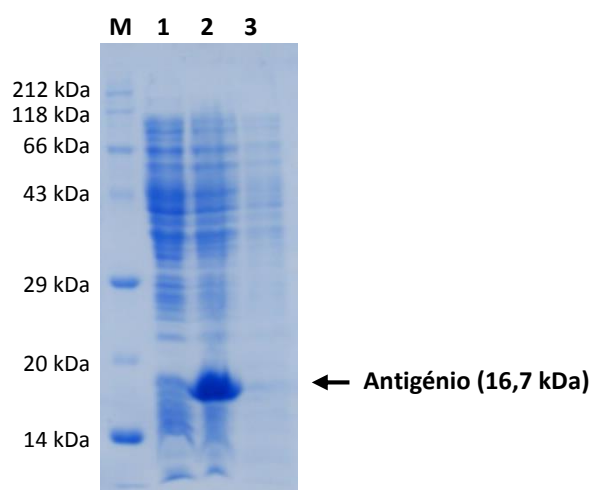


Figura 3.5 Gel de SDS-PAGE a 15%. M - Marcador de pesos moleculares; 1 - *E. coli* com o vetor de expressão mas sem indução por IPTG; 2 - *E. coli* com o vetor de expressão e com indução por IPTG; 3 - *E. coli* sem o vetor de expressão e com indução por IPTG.

Para *E. coli* com o vetor de expressão pLATE31 sem indução por IPTG, é observável a presença de uma banda com o peso molecular de 16,7 kDa, referente ao antígeno. Após a indução da expressão por IPTG, a presença do antígeno é mais notória, observando-se uma banda mais intensa e de grande dimensão. A bactéria *XJb (DE3)* contém o gene que codifica para a T7 RNA polimerase sob o controlo do promotor *lacUV5*, sendo capaz de produzir a T7 RNA polimerase quando o promotor *lacUV5* é induzido com IPTG<sup>77</sup>. De acordo com a **Figura A.1** (ver no **Anexo 1**), o vetor de expressão pLATE31 faz uso do promotor da T7 RNA polimerase para controlo da expressão dos genes heterólogos em *E. coli*.



Desta forma, na presença de IPTG há indução da expressão do gene que codifica a T7 RNA polimerase que se liga ao promotor  $P_{T7}$  e transcreve o antígeno rsm<sup>77</sup>.

No caso de *E. coli* sem o vetor de expressão pLATE31, a adição de IPTG apenas induz a expressão de proteínas intrínsecas à bactéria. Como não contém o vetor de expressão pLATE31 não se verifica a presença da proteína em estudo. Estes resultados demonstram que a transformação de *E. coli* XJb (DE3) com o vetor de expressão foi bem-sucedida e que o vetor de expressão é induzido por IPTG, permitindo a obtenção de elevadas quantidade do antígeno recombinante.

### 3.4 Expressão, produção e purificação do antígeno em *E. coli* XJb (DE3)

*E. coli* XJb (DE3) incubou a 37°C para que as bactérias se multiplicassem exponencialmente. Para assegurar que as bactérias se encontravam na fase exponencial foi necessário monitorizar o crescimento celular pela leitura da absorvância a 600 nm, entre 0,6 e 1, para posteriormente se induzir a expressão do antígeno com IPTG<sup>60</sup>. Ao crescimento induzido adicionou-se L-arabinose para induzir o fenótipo de autólise. Este açúcar não metabolizável é suplementado com cloreto de magnésio, que tem como função estabilizar a parede celular até se proceder ao ciclo de congelação e de descongelação<sup>77</sup>.

As células foram novamente concentradas por centrifugação e ressuspensas em tampão de lise que tem na sua composição detergentes que auxiliam na lise celular. A adição de DNase I permite clivar o DNA genómico das bactérias e consequentemente reduzir a viscosidade do lisado. A lise celular foi complementada com dois ciclos de congelação e de descongelação para garantir que as células eram completamente lisadas. A fração insolúvel (sedimento) e solúvel (sobrenadante) foram separadas por centrifugação e analisadas por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15 % (**Figura 3.6**), sendo que o ensaio foi realizado em duplicado.

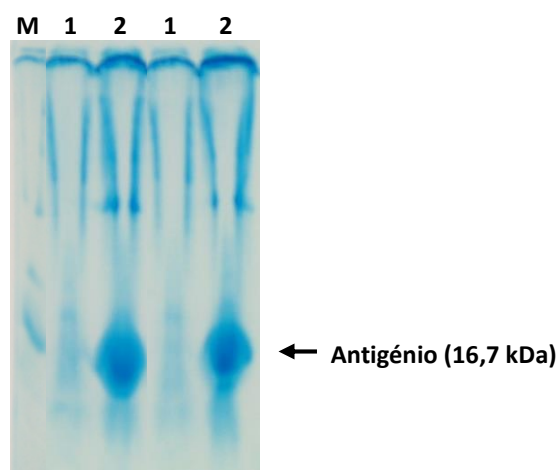


Figura 3.6 Gel de SDS-PAGE a 15% após a lise celular de *E. coli* XJb (DE3). M - Marcador de pesos moleculares; 1 - Sobrenadante; 2 - Sedimento.

Apesar do marcador de pesos moleculares não estar bem definido, é possível constatar a presença do antigénio nas frações insolúveis, uma vez que se observam bandas de forte intensidade e grande dimensão. Este resultado pode ser comprovado pelo gel de SDS-PAGE a 15% apresentado na **Figura 3.5**, pois para *E. coli* com o vetor de expressão pLATE31 após a indução da expressão por IPTG também se observa uma banda intensa com o peso molecular de 16,7 kDa, correspondente ao peso molecular do antigénio em estudo.

Quando comparadas as **Figuras 3.2** e **3.6**, verifica-se que se obteve maior quantidade de antigénio a partir de *E. coli* XJb (DE3) comparativamente a *E. coli* BL21 Star (DE3), uma vez que se observam bandas mais intensas, referentes ao antigénio, para a estirpe bacteriana XJb (DE3).

O facto de se verificar a presença do antigénio nas frações insolúveis indica que o antigénio rsm é expresso em corpos de inclusão. Os IB são agregados de proteínas que resultam da sobre-expressão de proteínas recombinantes em bactérias. A renaturação dos IB consiste na solubilização dos agregados de proteínas utilizando agentes desnaturantes, como a ureia<sup>79</sup>. Por este motivo antes de se proceder à purificação, cada sedimento foi ressuspensionado em ureia a 8 M com o fundamento de solubilizar os IB.

O antigénio foi purificado por cromatografia de afinidade de ião metálico com recurso a uma resina que contém o grupo funcional ácido nitrilotriacético (NTA, do inglês *Nitrilotriacetic Acid*) que quela o ião metálico níquel (níquel-NTA). Esta técnica cromatográfica baseia-se na interação entre as proteínas em solução e o ião metálico imobilizado num suporte sólido, sendo frequentemente utilizada na purificação de proteínas recombinantes com cauda de histidinas, pois este aminoácido apresenta elevada afinidade e especificidade para a IMAC<sup>66,80</sup>. Deste modo, é possível obter a proteína em estudo com elevado grau de pureza. Quando a fração insolúvel passa através da coluna, o antigénio contendo

uma cauda de seis histidinas fica agarrado à mesma enquanto as restantes proteínas são eluídas. A presença de uma elevada concentração de imidazole, no tampão de eluição, faz com que esta molécula concorra com a cauda de histidinas na ligação ao ião metálico e por conseguinte o antígeno recombinante é eluído.

A purificação foi feita com recurso a um tampão de lavagem e um tampão de eluição, sendo que o volume eluído de cada purificação foi avaliado por ELISA indireto (**Figura 3.7**). O teste ELISA aplicado neste estudo recorre a um anticorpo policlonal produzido contra a proteína em estudo anti-*P. jirovecii*<sup>16</sup>, capaz de detetar esta proteína recombinante. Por sua vez, o anticorpo secundário conjugado com a enzima fosfatase alcalina liga-se ao anticorpo primário e na presença de substrato há formação de cor amarela. Desta forma, por ELISA é possível inferir em que frações se encontra o antígeno rsm.

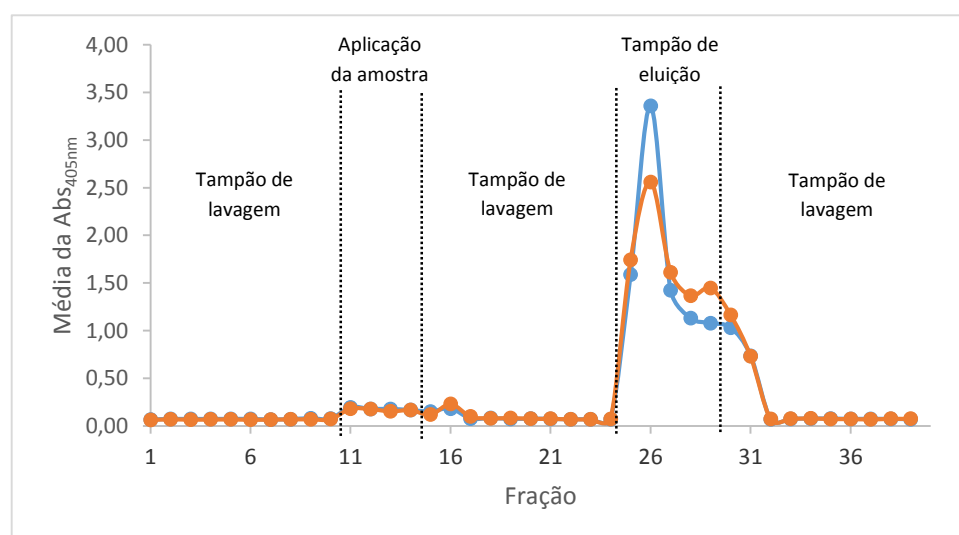


Figura 3.7 Ensaio de ELISA resultante da purificação do antígeno rsm por IMAC.

De acordo com a **Figura 3.7**, observa-se o aumento significativo da absorvância entre as frações 25 a 31 indicativo de que o antígeno foi eluído da coluna pelo tampão eluição, tal como seria de esperar. As frações 25 a 31 foram concentradas com acetona com o objetivo de concentrar o antígeno. As proteínas são estáveis em solução devido às interações entre os grupos hidrofílicos presentes à superfície das mesmas e a água. Se a polaridade do solvente diminuir pela adição de um solvente orgânico menos polar do que a água, neste caso a acetona, as proteínas tendem a ser menos solúveis. O decréscimo da constante dielétrica pela adição de um solvente orgânico provoca uma diminuição do poder de solvatação da água para os grupos hidrofílicos presentes à superfície das proteínas, como tal a solubilidade das proteínas diminui e ocorre a precipitação<sup>52</sup>.

Após a adição de acetona, centrifugou-se a amostra e tentou-se ressuspender o sedimento, no entanto, o sedimento não foi totalmente solubilizado. Terminada a diálise, como a amostra

permanecia precipitada no interior da fita de diálise, centrifugou-se novamente. O sobrenadante e o sedimento foram avaliados por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15%, como se apresenta na **Figura 3.8**.

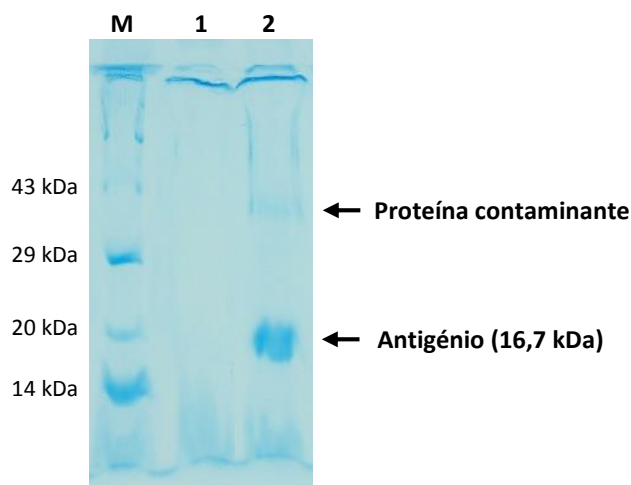


Figura 3.8 Gel de SDS-PAGE a 15% após concentrar o antigénio com acetona. M - Marcador de pesos moleculares; 1 - Sobrenadante; 2 - Sedimento.

Pela **Figura 3.8** é possível constatar a presença do antigénio no sedimento, o que revela que a adição de acetona tende a desnaturar a proteína em estudo, tornando-a insolúvel. Deste modo, é possível inferir que o uso de acetona não parece ser o método mais adequado para concentrar e manter a solubilidade do antigénio. Também se verifica a presença de uma proteína contaminante com o peso molecular aproximado de 38 kDa, o que significa que o antigénio não se encontra totalmente puro. Uma vez que a proteína em estudo não foi totalmente solubilizada não se determinou a concentração.

### 3.5 Otimização da expressão, produção e purificação do antigénio em *E. coli* XJb (DE3)

Com o intuito de obter maior quantidade de antigénio, para posteriormente se proceder à formação dos bionanoconjugados em quantidade suficiente para os estudos de deteção, foi necessário otimizar a expressão, produção e purificação do antigénio rsm.

Após indução da expressão da proteína de interesse por IPTG, o volume de 600 mL correspondente ao crescimento bacteriano foi dividido por oito *falcons*, para posteriormente ser mais fácil de purificar o antigénio rsm. Em cada *falcon* adicionou-se a mesma concentração de L-arabinose com o fundamento de induzir o fenótipo de autólise. As células foram concentradas por centrifugação e cada sedimento foi ressuspenso em tampão de lise juntamente com DNase I. A lise celular foi

suplementada por dois ciclos de congelação e descongelação. As frações solúveis e insolúveis foram separadas por centrifugação e analisadas por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15 % (**Figura 3.9**).

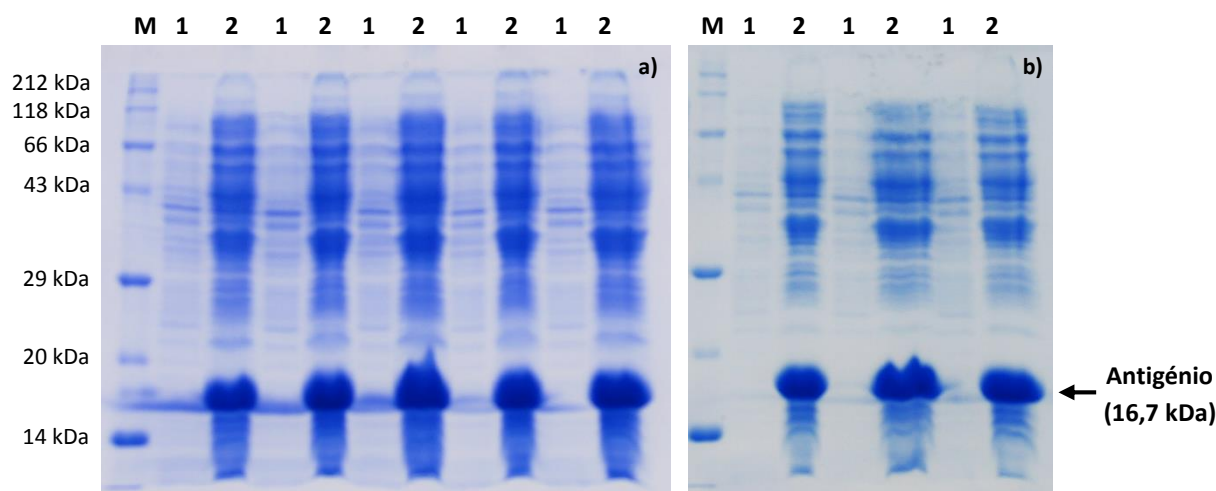


Figura 3.9 a) e b) Gel de SDS-PAGE a 15% após a lise celular de *E. coli* XJb (DE3). M - Marcador de pesos moleculares; 1 - Sobrenadante; 2 - Sedimento.

Pela análise da **Figura 3.9**, observam-se bandas intensas correspondentes ao antígeno nos oito sedimentos. Tal como se verificou na **Figura 3.6**, após a lise celular o antígeno permanece na fração insolúvel, o que demonstra que a proteína em estudo é expressa em corpos de inclusão. Desta forma, cada sedimento foi ressuspensionado em ureia a 8M por forma a solubilizar os IB, bem como para desnaturar outras proteínas igualmente presentes na fração insolúvel que possam interferir com a ligação do antígeno à coluna de cromatografia. O gel de SDS-PAGE a 15% apresentado na **Figura 3.9** é representativo dos seis ensaios de expressão e produção realizados ao longo deste estudo, tendo-se sempre obtido resultados semelhantes.

No decorrer deste estudo experimentaram-se técnicas alternativas para purificar e concentrar o antígeno, descritas nos seguintes ensaios:

#### *1º Ensaio - Purificação por IMAC seguido de PEG 8000*

No total purificaram-se cinco amostras por IMAC, através de uma resina de ião níquel, com recurso a um tampão de lavagem e um tampão de eluição. Os volumes obtidos para cada purificação foram analisados por ELISA (**Figura 3.10**).

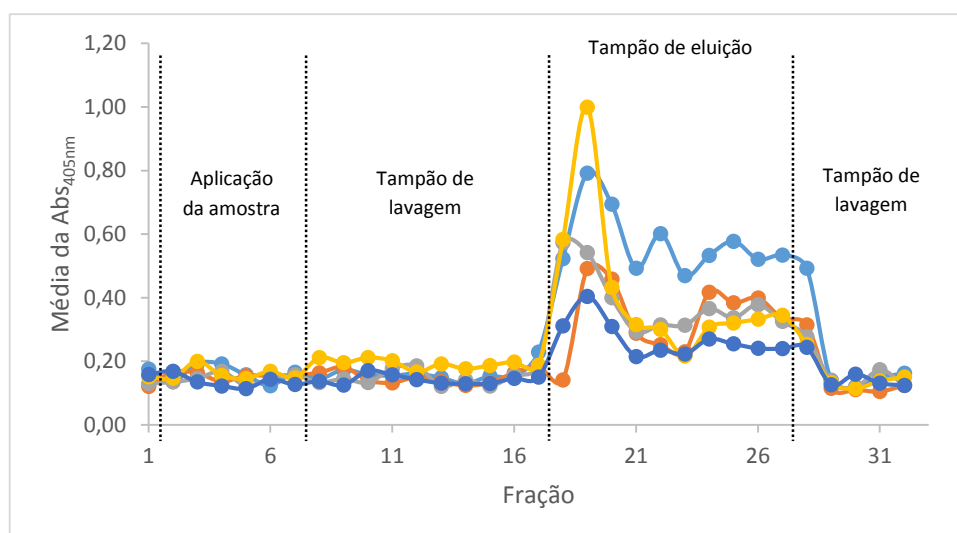


Figura 3.10 Ensaio de ELISA decorrente da purificação do antígeno rsm por IMAC.

De acordo com a **Figura 3.10**, observa-se o aumento da absorvância entre as frações 18 a 28, o que revela que o antígeno foi eluído da coluna pelo tampão de eluição, tal como seria de esperar. Quando comparada com a **Figura 3.7**, verifica-se que o aumento do volume de tampão de eluição permitiu obter maior quantidade de antígeno.

Por forma a concentrar o antígeno, juntaram-se as frações numeradas de 18 a 28 numa fita de diálise, que posteriormente foi coberta com PEG 8000. O polietilenoglicol é um polímero higroscópico que tem a capacidade de absorver a água<sup>81</sup>. Por este motivo, quando colocado sobre a fita de diálise permite concentrar o antígeno, uma vez que absorve a água do interior da fita de diálise. Como a fita de diálise tem uma porosidade (12,4 kDa) inferior ao peso molecular do PEG 8000 (8000 kDa), não existe a possibilidade de contaminar a amostra com este polímero.

Depois de se concentrar a amostra com PEG 8000, verificou-se a existência de precipitado no interior da fita de diálise. Terminada a diálise, como a amostra permanecia precipitada centrifugou-se, todavia, o sedimento não foi totalmente solubilizado. Deste modo, o sobrenadante e o sedimento foram avaliados por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15% (**Figura 3.11**).

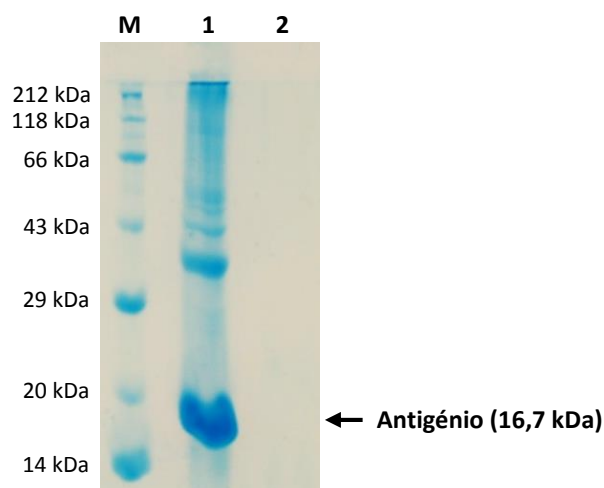


Figura 3.11 Gel de SDS-PAGE a 15% após concentrar o antígeno com PEG 8000. M- Marcador de pesos moleculares; 1 - Sedimento; 2 - Sobrenadante.

Como o antígeno tende a desnaturar depois de concentrado com PEG 8000, pela **Figura 3.11** verifica-se a presença da proteína em estudo no sedimento. Este resultado demonstra que o método de desidratação por PEG 8000 não é o método mais apropriado para concentrar o antígeno, uma vez que o PEG 8000 tende a desnaturar o antígeno, tornando-o insolúvel. Desta forma, é possível inferir que quando o antígeno está muito concentrado tende a desnaturar, provavelmente devido a interações entre as moléculas do antígeno por forças de *van der Waals*. A par do antígeno, também se observa a presença de proteínas contaminantes com o peso molecular superior ou aproximado de 38 kDa, revelando que este não está totalmente puro. Como o antígeno não foi totalmente solubilizado não se determinou a concentração.

## *2º Ensaio - Purificação por IMAC com gradiente descontínuo de imidazole, seguido de PEG 8000*

Com o intuito de eliminar as proteínas contaminantes visíveis nas **Figuras 3.8 e 3.11**, purificou-se uma amostra através de uma resina de íon níquel, por um gradiente descontínuo de soluções de imidazole a 20, 100, 200 e 500 mM. Os volumes resultantes desta purificação foram analisados por ELISA, como se pode visualizar na **Figura 3.12**.

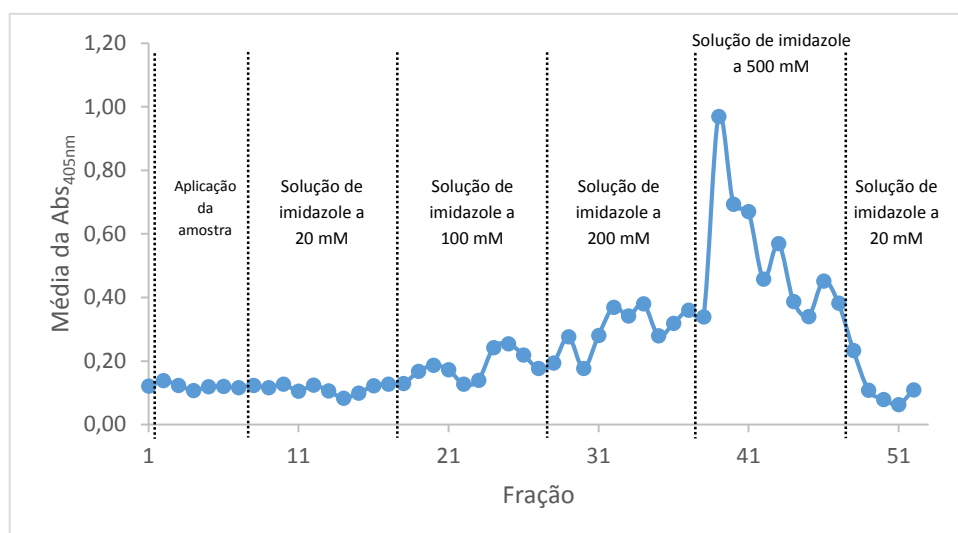


Figura 3.12 Ensaio de ELISA resultante da purificação do antígeno rsm por IMAC.

A absorvância manteve-se relativamente estável (aproximadamente 0,12) entre as frações 2 a 17, o que demonstra que não houve eluição do antígeno desde o momento que se aplicou a amostra na coluna até ao fim da lavagem da coluna de cromatografia com a solução de imidazole a 20 mM. Entre as frações 18 a 47 verifica-se o aumento gradual da absorvância indicativo de que o antígeno foi eluído da coluna pelas soluções de imidazole a 100, 200 e 500 mM. Todavia, o efeito é mais notório entre as frações 38 a 47 o que permite inferir que o antígeno foi maioritariamente eluído pela solução de imidazole a 500 mM. Com o aumento da concentração de imidazole, as moléculas de imidazole vão competindo com a cauda de histidinas na ligação ao ião metálico e como tal, as proteínas ligadas são eluídas.

Os volumes eluídos com as soluções de imidazole a 100, 200 e 500 mM foram concentrados em fitas de diálise com PEG 8000, contudo, verificou-se a formação de precipitado no interior das três fitas de diálise. Após a diálise, como as amostras permaneciam precipitadas foram centrifugadas, porém, os sedimentos não foram totalmente solubilizados. Por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15% foi possível avaliar a metodologia aplicada (**Figura 3.13**).



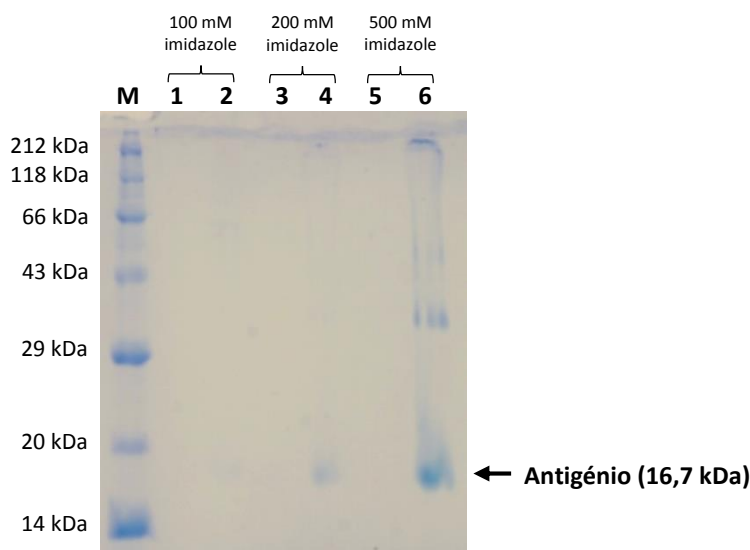


Figura 3.13 Gel de SDS-PAGE a 15% após a purificação do antígeno por um gradiente de 100, 200 e 500 mM de imidazole. M - Marcador de pesos moleculares; 1 - Sobrenadante; 2 - Sedimento; 3 - Sobrenadante; 4 - Sedimento; 5 - Sobrenadante; 6 - Sedimento.

De acordo com a **Figura 3.13**, para a solução de imidazole a 100 mM observa-se uma banda muito ténue no sedimento, indicativo da presença do antígeno. Para as soluções de imidazole a 200 e 500 mM a presença do antígeno recombinante nos sedimentos é mais notória, visto que se observam bandas mais intensas. Tal como se verificou no **1º Ensaio** o antígeno tende a desnaturar, tornando-se insolúvel, depois de concentrado com PEG 800, o que novamente demonstra que o recurso a este polímero não é o método mais apropriado para concentrar o antígeno. Quando comparadas as intensidades das bandas referentes ao antígeno, verifica-se que este foi maioritariamente eluído pela solução de imidazole a 500 mM, uma vez que apresenta uma banda mais intensa e de maior dimensão. Estes resultados comprovam os resultados obtidos na **Figura 3.12**, visto que o antígeno foi maioritariamente eluído da coluna pela solução de imidazole a 500 mM de imidazole - frações 38 a 47.

Para o sedimento relativo à solução de imidazole a 500 mM, podemos constatar a presença de outras proteínas contaminantes com o peso molecular aproximado de 38 e 50 kDa, o que demonstra que o antígeno não se encontra totalmente puro. Não se justifica aplicar este gradiente descontínuo de soluções de imidazole, uma vez que não permite aumentar o grau de pureza do antígeno, pois a proteína em estudo continua a ser maioritariamente eluída em conjunto com outras proteínas contaminantes, tal como no ensaio anterior no qual se usou apenas uma solução de eluição com imidazole a 500 mM. Além de que, o gradiente descontínuo aplicado torna o antígeno mais diluído.

### 3º Ensaio – Choque térmico seguido de purificação por IMAC e PEG 800

Na tentativa de aumentar o grau de pureza da proteína em estudo sujeitou-se uma amostra a um choque térmico a 100°C, durante 10 min. A estrutura terciária das proteínas é mantida por interações hidrofóbicas, pontes de hidrogénio e dissulfureto. Quando uma proteína é submetida a um choque térmico estas ligações são rompidas e a proteína apenas apresenta estrutura primária (sequência de aminoácido), ou seja, a proteína desnatura e perde a sua actividade biológica<sup>52</sup>.

Após o choque térmico, a amostra foi purificada por IMAC a partir de uma resina de ião níquel. Para a purificação recorreu-se a um gradiente descontínuo de soluções de imidazole a 20, 100 e 500 mM. Os volumes resultantes da purificação foram avaliados por ELISA, como ilustrado na **Figura 3.14**.

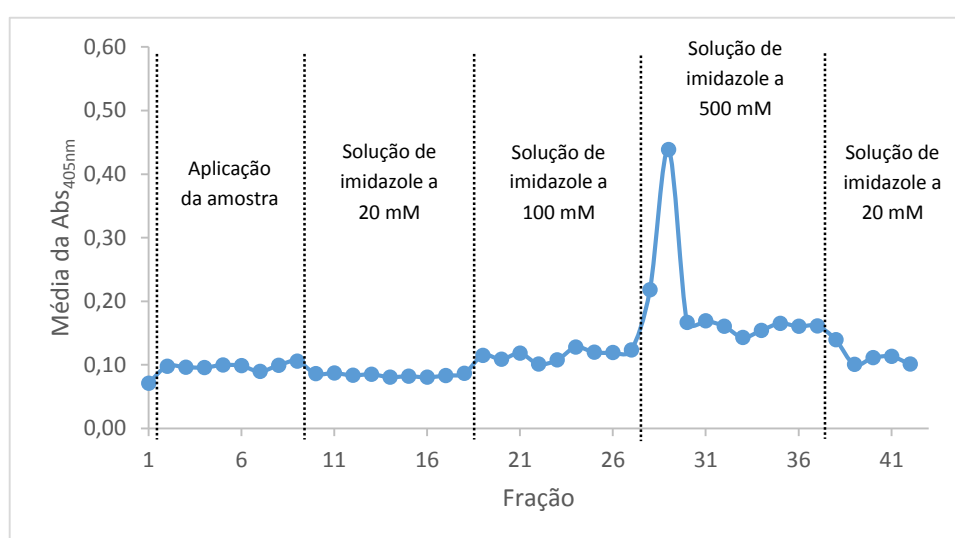


Figura 3.14 Ensaio de ELISA após a purificação do antígeno rsm por IMAC.

De acordo com a **Figura 3.14**, é possível constatar que a absorvância se manteve constante entre as frações 2 a 27, indicativo de que não houve eluição do antígeno. Quando a coluna de cromatografia é lavada com a solução de imidazole a 500 mM (frações 28 a 37) verifica-se o aumento significativo da absorvância, revelando a eluição do antígeno da coluna de cromatografia.

Por forma a concentrar o antígeno, juntaram-se as frações 28 a 37 numa fita de diálise e esta foi coberta com PEG 8000. Após este passo, verificou-se a existência de precipitado no interior da fita de diálise. A amostra foi dialisada e como se continuava a observar a existência de precipitado no interior da fita de diálise, centrifugou-se, porém o sedimento não foi totalmente solubilizado. O resultado do choque térmico e da purificação foram analisados por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15%, como se apresenta na **Figura 3.15**.

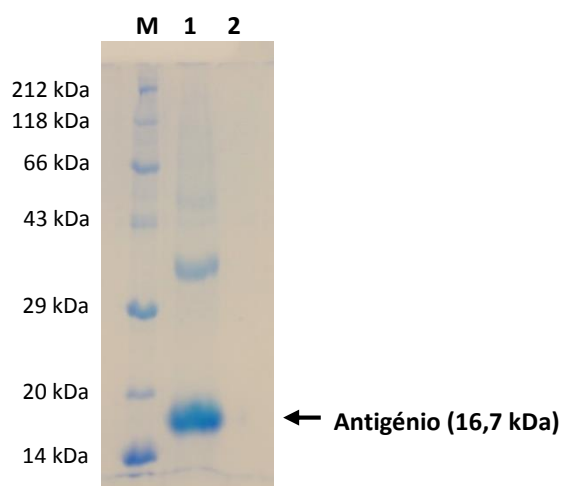


Figura 3.15 Gel de SDS-PAGE a 15%. M - Marcador de pesos moleculares; 1 - Sedimento; 2 - Sobrenadante.

Pela **Figura 3.15** é observável a presença da proteína em estudo no sedimento. Tal como se verificou nos dois ensaios anteriores, depois de concentrar a amostra com PEG 8000 o antígeno tende a desnaturar, tornando-se insolúvel, o que justifica a presença do antígeno na fração insolúvel. Também se verifica a presença de outras proteínas contaminantes com o peso molecular aproximado de 38 e 50 kDa, revelando que o antígeno não se encontra totalmente puro. Seria de esperar que o choque térmico a 100°C, durante 10 min, desnaturasse as proteínas contaminantes e que estas fossem eluídas da coluna de cromatografia quando a amostra foi aplicada na coluna ou em alternativa pelas soluções de imidazole a 20 ou 100 mM. Desta forma seria possível aumentar o grau de pureza do antígeno, todavia, isto não se verificou. De acordo com os resultados obtidos, é possível inferir que tanto as proteínas contaminantes como o antígeno são relativamente estáveis à temperatura de 100°C, pelo período de 10 min. Como o antígeno não foi totalmente solubilizado não se determinou a sua concentração.

#### *4º Ensaio - Purificação por IMAC seguido de PEG 8000 e ultraconcentração Amicon*

No total purificaram-se seis amostras por cromatografia de afinidade de íão metálico através de uma resina de íão níquel, utilizando um tampão de lavagem e um tampão de eluição. Os volumes obtidos de cada purificação foram avaliados por ELISA (**Figura 3.16**).

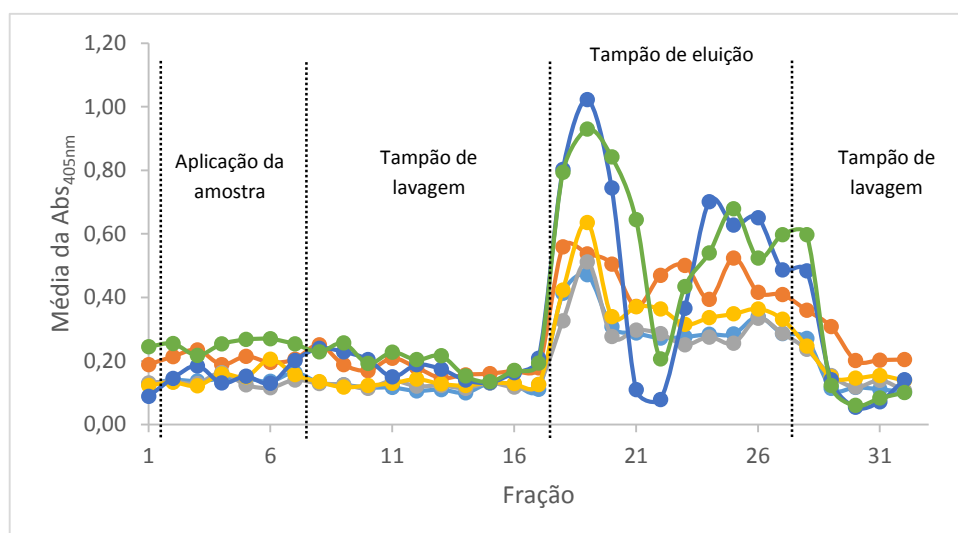


Figura 3.16 Ensaio de ELISA resultante da purificação do antígeno rsm por IMAC.

Atendendo aos resultados obtidos na **Figura 3.16**, é possível constatar o aumento significativo da absorbância para as frações 18 a 27 referentes às seis purificações, revelando que o antígeno foi eluído da coluna de cromatografia pelo tampão de eluição. Por forma a concentrar o antígeno, juntaram-se as frações 18 a 27 resultantes das seis purificações numa fita de diálise, que seguidamente foi coberta com PEG 8000. Enquanto se concentrava o antígeno com PEG não se observou a olho nu a formação de precipitado no interior da fita de diálise, ao contrário do que se verificou nos ensaios anteriores. Possivelmente existe um volume crítico até ao qual a proteína em estudo pode ser concentrada. Neste caso, quando se concentrou com PEG 8000, provavelmente esse volume crítico não foi atingido e como tal não se verificou a olho nu a formação de precipitado.

O antígeno foi novamente concentrado mas desta vez num sistema de ultraconcentração *Amicon*, com uma membrana de 30 kDa, com o intuito de aumentar o grau de pureza da proteína em estudo. Porém, verificou-se a formação de precipitado à medida que a amostra era concentrada no *Amicon*. Possivelmente o antígeno adsorveu à membrana do *Amicon*, o que poderá ter favorecido a sua desnaturação. Associado a este fator, o PEG 8000 também poderá ter contribuído para a desnaturação do antígeno, apesar de não se ter verificado a existência de precipitado no interior da fita de diálise. Deste modo, o volume concentrado foi avaliado por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15%, como apresentado na **Figura 3.17**.

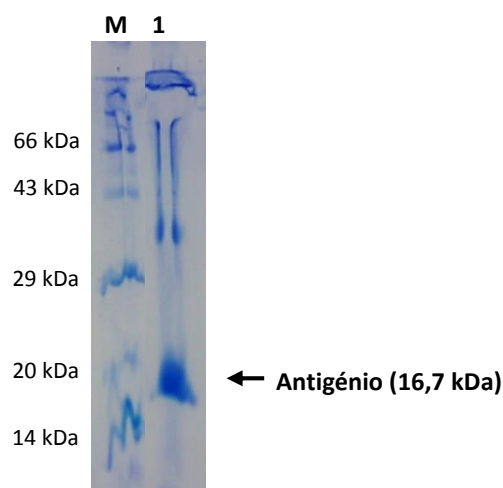


Figura 3.17 Gel de SDS-PAGE a 15%. M - Marcador de pesos moleculares; 1 - Antigénio rsm.

Pela **Figura 3.17** verifica-se a presença de uma banda com o peso molecular de 16,7 kDa, referente ao antigénio, bem como a presença de proteínas contaminantes com o peso molecular superior ou aproximado de 38 kDa. Deste modo, é possível inferir que concentrar o antigénio com PEG 8000 e posteriormente com o sistema de ultraconcentração *Amicon*, não é o método mais apropriado para concentrar o antigénio, uma vez que este tende a precipitar.

#### 5º Ensaio - Purificação por IMAC seguido de ultraconcentração *Amicon*

Por cromatografia de afinidade de ião metálico purificaram-se oito amostras através de uma resina de ião níquel, com recurso a um tampão de lavagem e de eluição. Os volumes decorrentes de cada purificação foram avaliados por ELISA, como ilustra a **Figura 3.18**.

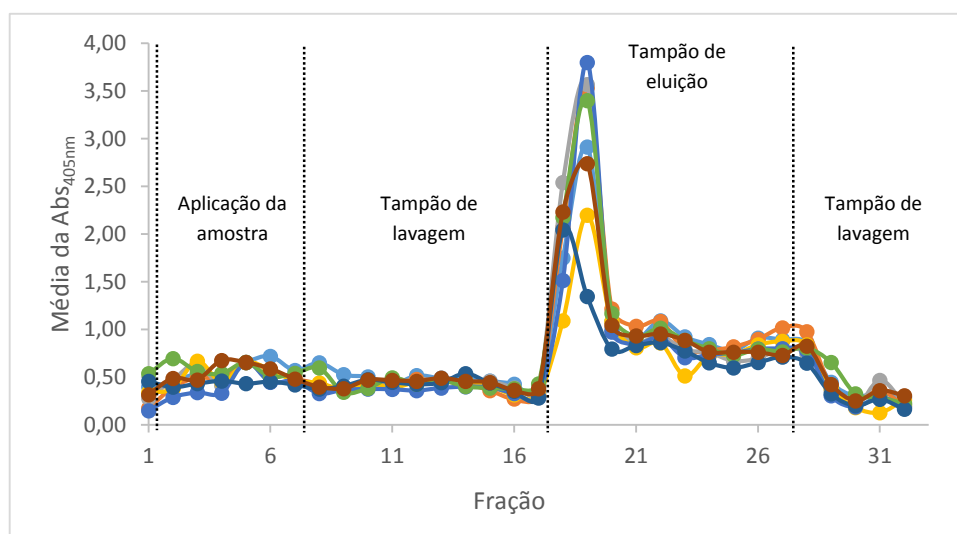


Figura 3.18 Ensaio de ELISA resultante da purificação do antigénio rsm por IMAC.

Para as oito purificações observa-se o aumento da absorvância entre as frações 18 a 28, no entanto, a absorvância é maior entre as frações 18 a 20, indicativo de que o antígeno foi maioritariamente eluídos nestas três primeiras frações. Com o intuito de concentrar o antígeno, as frações 18 a 27, decorrentes das seis purificações, foram concentradas num sistema de ultraconcentração *Amicon*. Todavia, este método mostrou-se ineficaz, uma vez que se observou a formação de precipitado à medida que a amostra era concentrada. Tal como aconteceu no **4º Ensaio**, possivelmente o antígeno adsorveu à membrana do sistema de ultraconcentração *Amicon*.

Por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15% não foram visíveis bandas no gel, possivelmente pelo facto de se ter observado ao longo de todo o processo de centrifugação no sistema de ultrafiltração *Amicon* a precipitação da proteína em estudo.

O índice GRAVY (do inglês, *GRand AVerage of hidropathicity*) indica a solubilidade das proteínas. Este índice é calculado pelo quociente entre a soma dos valores de hidrofobicidade de todos os aminoácidos que constituem a proteína pelo número de resíduos na sequência. Assim, um valor positivo de GRAVY indica que a proteína é hidrofóbica, enquanto um valor negativo revela que a proteína é hidrofílica<sup>82</sup>.

Quando comparado o índice GRAVY da BSA (-0,433)<sup>82</sup>, uma proteína frequentemente utilizada em laboratório devido à sua elevada solubilidade, com o índice de GRAVY do antígeno rsm (-0,702)<sup>16</sup>, verifica-se que o antígeno é mais hidrofílico do que a BSA. Apesar de o antígeno apresentar baixo índice GRAVY, de entre as metodologias aplicadas para concentrar a proteína em estudo (acetona, PEG 8000 e/ou sistema ultraconcentração *Amicon*) sempre se verificou a formação de precipitado. Por este motivo, é possível inferir que o antígeno é relativamente instável quando se tenta concentrar.

#### *6º Ensaio - Purificação por IMAC com quatro iões metálicos diferentes*

Além do níquel, as proteínas marcadas com cauda de histidinas podem ser purificadas recorrendo a colunas com NTA ligado a outros iões metálicos como iões cobre, zinco e cobalto. Por forma a otimizar a purificação do antígeno rsm, purificaram-se quatro amostras utilizando os quatro iões metálicos acima mencionados com recurso a um tampão de lavagem e de eluição. Por ELISA avaliaram-se os volumes resultantes de cada purificação (**Figura 3.19**).

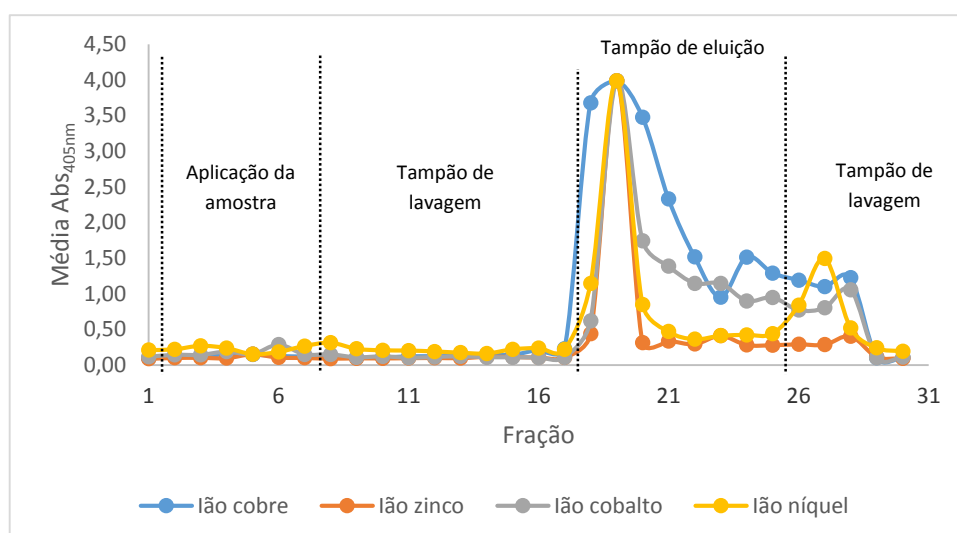


Figura 3.19 Ensaio de ELISA resultante da purificação do antígeno por IMAC com quatro íons metálicos diferentes.

Para os íons cobre e cobalto verifica-se o aumento significativo da absorvância entre as frações 18 a 20, o que demonstra que o antígeno foi eluído da coluna pelo tampão de eluição. Embora se verifique que entre as frações 21 a 27 também houve uma ligeira eluição do antígeno. Para os íons zinco e níquel é observável o aumento significativo da absorvância entre as frações 18 a 20, revelando que o antígeno foi maioritariamente eluído nestas três frações. Pelos valores de absorvância para as quatro purificações, é possível inferir que se obteve maior quantidade de proteína purificada quando se utilizaram os íons cobre e cobalto comparativamente aos íons zinco e níquel, revelando que o antígeno tem maior afinidade para os íons metálicos  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$ .

As frações 18 a 27 de cada purificação foram concentradas numa fita de diálise com PEG 8000, todavia, verificou-se a formação de precipitado no interior de cada uma das fitas de diálise. As amostras foram dialisadas e como se continuava a observar a existência de precipitado, centrifugaram-se. Descartaram-se os sobrenadantes e tentou-se ressuspender os sedimentos, porém, estes não foram totalmente solubilizados. Por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15% (**Figura 3.20**) determinou-se o efeito dos quatro íons metálicos na purificação da proteína em estudo.

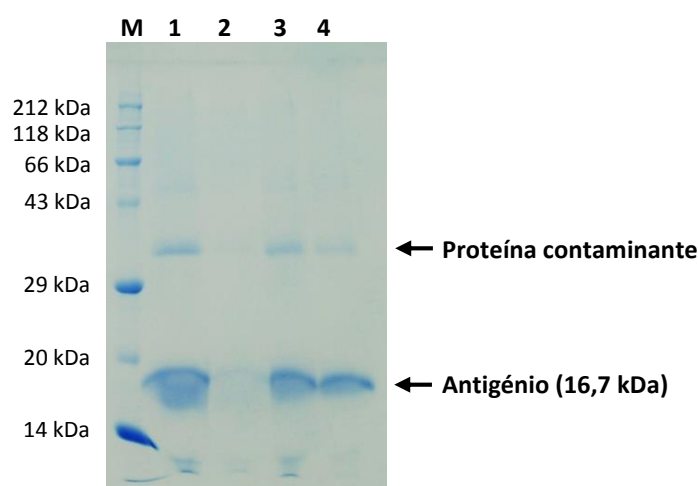


Figura 3.20 Gel de SDS-PAGE a 15%. M - Marcador de pesos moleculares; 1 - Ião cobre; 2 - Ião zinco; 3 - Ião cobalto; 4 - Ião níquel.

Através da **Figura 3.20** observam-se bandas com o peso molecular de 16,7 kDa, referentes ao antígeno, para os quatro iões metálicos. Quando comparadas as dimensões das bandas é possível inferir que através do ião cobre se purificou maior quantidade de antígeno, uma vez que se observa uma banda de maior dimensão, tal como se verificou na **Figura 3.19**. Quando utilizado o ião zinco, a quantidade de proteína purificada foi menor, indicativo de que o antígeno tem menor afinidade para o zinco comparativamente aos restantes metais. Enquanto para o cobalto e para o níquel, de acordo com a dimensão das bandas, a quantidade de antígeno parece ser semelhante. Para os quatro iões metálicos é possível constatar que o antígeno não se encontra totalmente puro, visto que se observam bandas com o peso molecular aproximado de 38 kDa relativas a uma proteína contaminante de *E. coli*.

Uma vez que os sedimentos não foram totalmente solubilizados, não se determinou a concentração de antígeno para cada purificação. No entanto, analisando as **Figuras 3.19** e **3.20**, é possível inferir que este ensaio permitiu otimizar a purificação do antígeno, visto que para o ião cobre se obteve maior quantidade de proteína em comparação com os outros três iões metálicos.

### 7º Ensaio - Purificação por IMAC de ião cobre com gradiente descontínuo de imidazole

Pela análise da **Figura 3.20** verifica-se a presença de uma proteína contaminante com o peso molecular aproximado de 38 kDa para o ião cobre. Por forma a eliminar esta proteína contaminante e consequentemente aumentar o grau de pureza do antígeno, purificou-se uma amostra por IMAC com uma resina de ião cobre por um gradiente descontínuo de soluções de imidazole a 20, 100, 200 e 500 mM. Os volumes resultantes da purificação foram analisados por ELISA, como ilustrado na **Figura 3.21**.



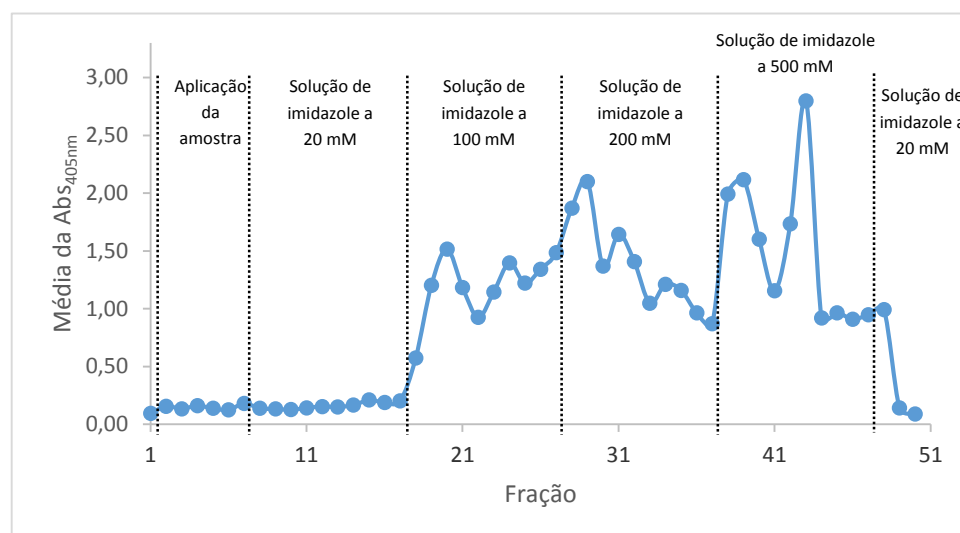


Figura 3.21 Ensaio de ELISA resultante da purificação do antígeno rsm por IMAC.

Para a **Figura 3.21** é possível constatar o aumento da absorvância entre as frações 18 a 47, o que demonstra que o antígeno foi eluído da coluna de cromatografia pelo gradiente de imidazole de 100, 200 e 500 mM. Para este ensaio experimentou-se somente dialisar as amostras, com o intuito de verificar se o antígeno tende a precipitar quando se tenta trocar o tampão da amostra.

Os volumes correspondentes aos tampões de imidazole de 100, 200 e 500 mM foram dialisados e não se verificou a formação de precipitado no interior das fitas de diálise, o que permite inferir que este método pode ser utilizado quando for necessário trocar o tampão da amostra. Possivelmente como o antígeno não foi concentrado, não tende a precipitar. Por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15% (**Figura 3.22**) foi possível avaliar o gradiente de imidazole de 100, 200 e 500 mM.

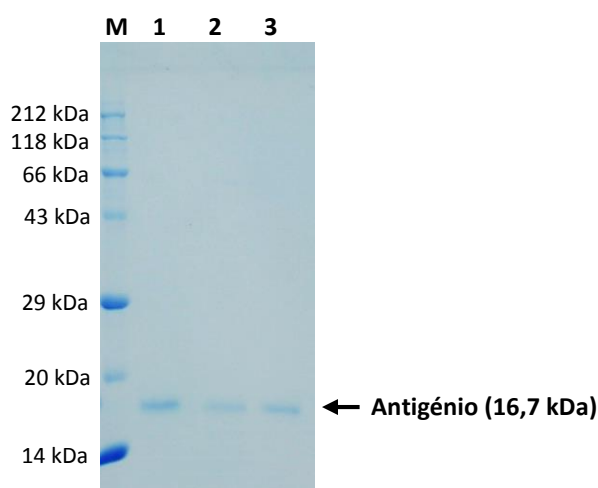


Figura 3.22 Gel de SDS-PAGE a 15%. M - Marcador de pesos moleculares; 1 - Solução de imidazole a 100 mM; 2 - Solução de imidazole a 200 mM; 3 - Solução de imidazole a 500 mM.

De acordo com a **Figura 3.22** é possível constatar que o antígeno foi eluído da coluna de cromatografia pelo gradiente de imidazole de 100, 200 e 500 mM, tal como se verificou na **Figura 3.21**.

Porém, não se visualiza a existência de proteínas contaminantes com o peso molecular aproximado de 38 kDa, ao contrário do que se verificou na **Figura 3.20** para o íão cobre. Possivelmente a quantidade de proteína contaminante presente em solução era pequena, e como não se concentrou o antígeno (por exemplo com PEG 8000) provavelmente a presença de proteínas contaminantes não é tão notória em gel de SDS-PAGE.

### 8º Ensaio - Purificação por IMAC e posteriormente por IEC

Purificou-se uma amostra por IMAC utilizando uma resina de cobre, com recurso a um tampão de lavagem e um tampão de eluição. Por ELISA analisaram-se os volumes resultantes da purificação (**Figura 3.23**).

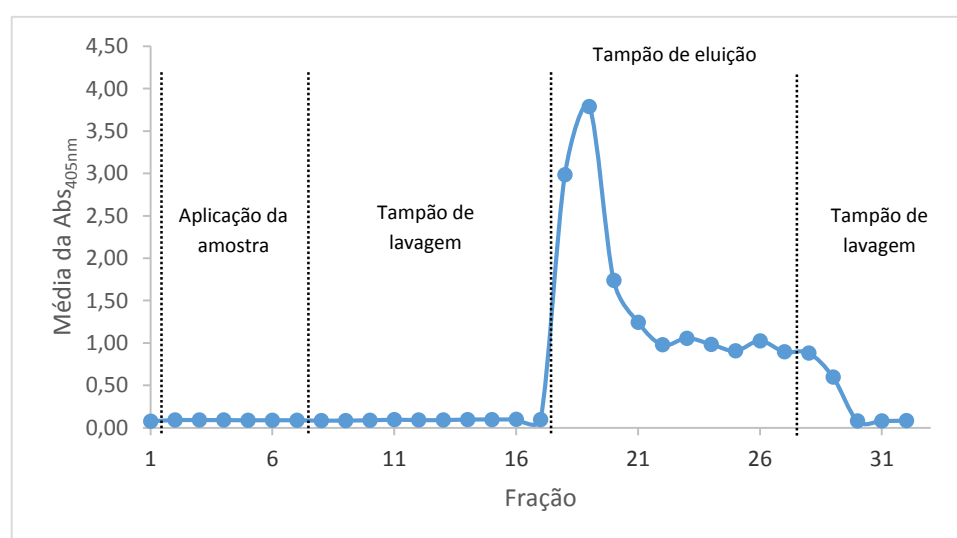


Figura 3.23 Ensaio de ELISA referente à purificação do antígeno rsm por IMAC.

Atendendo à **Figura 3.23** observa-se o aumento da absorvância entre as frações 18 a 27, indicativo de que o antígeno foi eluído da coluna de cromatografia pelo tampão de eluição. No entanto, é possível concluir que o antígeno foi maioritariamente eluído entre as frações 18 e 19, uma vez que apresentam maior valor de absorvância comparativamente às frações 20 a 27. As frações 18 e 19 foram analisadas separadamente das frações 20 a 37 por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15% (**Figura 3.24**).

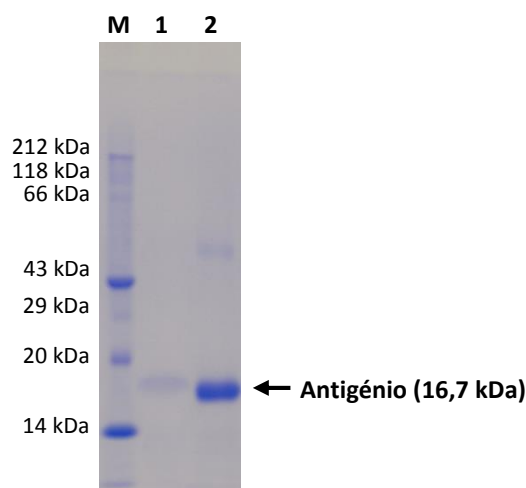


Figura 3.24 Gel de SDS-PAGE a 15%. 1 - Frações 20 a 27; 2 - Frações 18 e 19.

Pela **Figura 3.24** é observável a presença de bandas com o peso molecular de 16,7 kDa, referentes ao antígeno. Quando comparadas as intensidades das bandas, verifica-se que a banda referente às frações 18 e 19 é mais intensa que a banda correspondente às frações 20 a 37, o que permite inferir que o antígeno foi maioritariamente eluído entre as frações 18 e 19, tal como demonstrado na **Figura 3.23**. No entanto, para as frações 18 e 19 é possível constatar a presença de uma proteína contaminante com o peso molecular aproximado de 50 kDa, revelando que o antígeno não se encontra totalmente puro. Para as frações 20 a 27, como não se concentrou o antígeno (por exemplo com PEG 8000) provavelmente a presença de proteínas contaminantes não é tao notória em gel de SDS-PAGE.

Com o fundamento de eliminar a proteína contaminante com o peso molecular aproximado de 50 kDa e consequentemente aumentar o grau de pureza da proteína em estudo, purificou-se 1 mL resultante das frações 18 e 19, diluído em água destilada (1:10), por cromatografia de troca iónica (IEC, do inglês *Ion Exchange Chromatography*). A IEC permite separar proteínas em função da sua carga, pela ligação reversível de moléculas carregadas a uma fase estacionária que contém grupos com cargas opostas<sup>52</sup>. A fase estacionária pode ser uma resina aniónica (carregada positivamente) ou aniónica (carregada negativamente).

Uma vez que o pI do antígeno rsm é igual a 8,57<sup>16</sup> utilizou-se uma resina aniónica, enquanto o pH do tampão de lavagem e de eluição era igual a 9. Antes de aplicar a amostra na coluna de cromatografia, como o antígeno se encontrava em tampão de eluição da IMAC, foi necessário diluir a proteína em estudo em água destilada por forma a diluir as concentrações de fosfato de sódio, cloreto de sódio e imidazole, pois a presença de uma elevada força iónica na amostra poderia interferir com a ligação do antígeno à resina aniónica. A eluição foi feita com recurso ao aumento da força iónica. A presença de uma concentração elevada de NaCl na coluna de cromatografia permite eluir a proteína

em estudo, devido ao facto dos iões  $\text{Cl}^-$  competirem com o antigénio na ligação à resina aniónica. Os volumes decorrentes da IEC foram analisados por ELISA, como se apresenta na **Figura 3.25**.

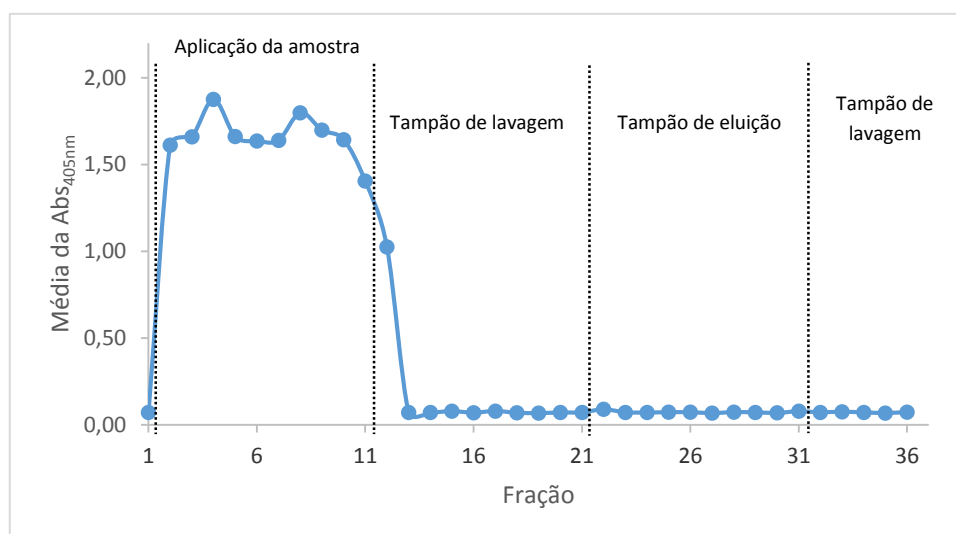


Figura 3.25 Ensaio de ELISA resultante da purificação do antigénio rsm por IEC.

Pela **Figura 3.25** verifica-se o aumento da absorvância entre as frações 2 e 11, indicativo de que o antigénio não se ligou à resina aniónica. Apesar de se ter diluído o antigénio em água destilada, possivelmente as concentrações de fosfato de sódio, cloreto de sódio e/ou de imidazole ainda eram muito elevadas o que poderá ter interferido na ligação do antigénio à resina aniónica. Além de que os tampões de ligação e de eluição podem não ser os mais adequados para purificar a proteína em estudo.

Analisando o gel de eletroforese SDS-PAGE a 15% que foi realizado e apresentado na **Figura 3.26**, observa-se uma banda muito ténue com o peso molecular de 16,7 kDa, correspondente ao antigénio. Dada a intensidade da banda é possível inferir que se perdeu alguma proteína no decorrer da purificação por IEC.

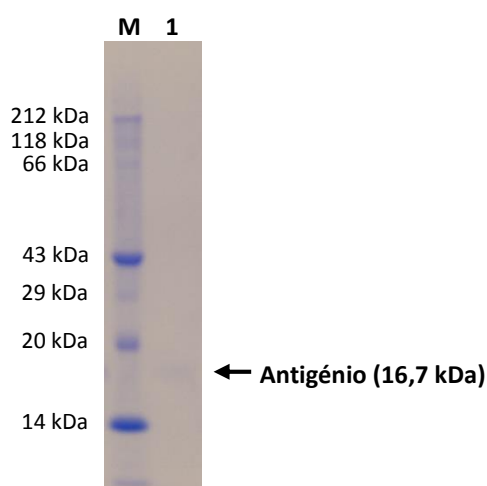
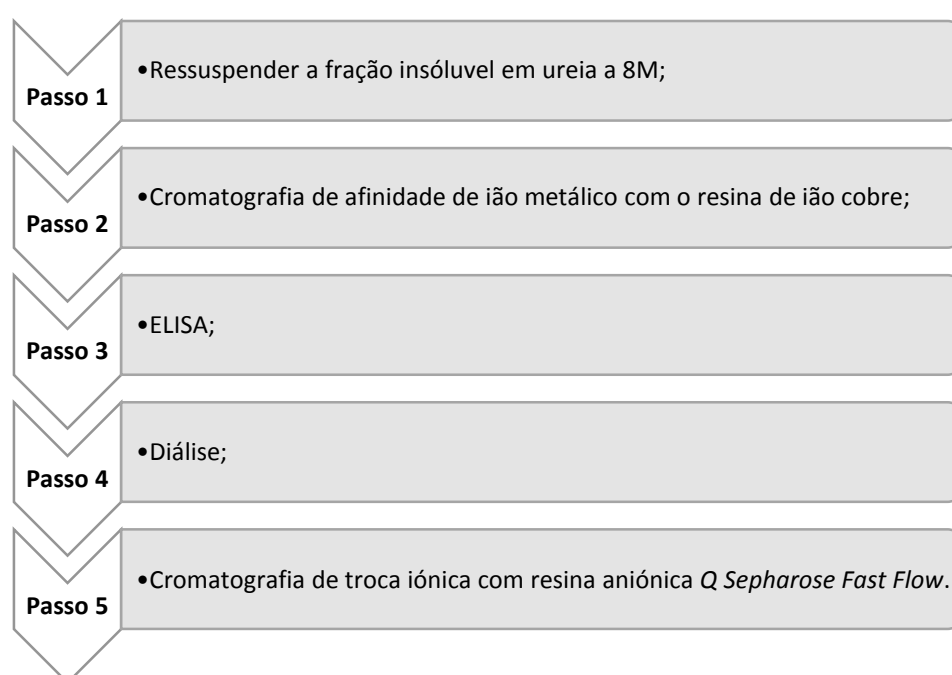


Figura 3.26 Gel de SDS-PAGE a 15%. M - Marcador de pesos moleculares; 1 - Antigénio rsm.

### *Protocolo otimizado para purificar o antígeno recombinante sintético multiepítopo*

De acordo com os resultados obtidos desde o **1º** até ao **8º Ensaio**, foi possível desenvolver um protocolo para purificar o antígeno rsm. Na **Figura 3.27** apresenta-se uma possível estratégia para eliminar as proteínas contaminantes de *E. coli* que são purificadas em conjunto com o antígeno (**Figura 3.24**). Os passos 1 a 3 foram otimizados no decorrer deste estudo, no entanto, os passos 4 e 5 necessitam de ser estudados futuramente. Apesar de no **8º Ensaio** se ter verificado que o antígeno não se ligou à coluna aniónica, no futuro podem-se variar alguns parâmetros com o intuito de verificar se a IEC com resina aniónica *Q Sepharose Fast Flow* permite ou não eliminar as proteínas contaminantes e por conseguinte aumentar o grau de pureza do antígeno.



*Figura 3.27 Fluxograma da metodologia a aplicar para purificar o antígeno rsm.*

Após a lise celular o sedimento será ressuspensionado em ureia a 8M por forma a solubilizar os corpos de inclusão (**Passo 1**). Seguidamente, o extrato que contém o antígeno será purificado por cromatografia de afinidade de ião metálico através de uma resina de ião cobre, com recurso a 10 mL de tampão de ligação (NaCl 500 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM; imidazole 20 mM; pH 7,4) e 10 mL de tampão de eluição (NaCl 500 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM; imidazole 500 mM; pH 7,4) (**Passo 2**). Por ELISA será possível confirmar a presença do antígeno nas frações eluídas com o tampão de eluição (**Passo 3**).

Tal como mencionando anteriormente, os **Passos 4 e 5** necessitam de ser estudados/otimizados. De forma a remover o tampão de eluição da IMAC, as frações mais concentradas em antígeno podem ser dialisadas numa coluna de dessalinização (por exemplo *HiTrap*

*Desalting*) ou numa fita de diálise contra tampão imidazole a 20 mM, pH 9,0. Para este passo será necessário conferir se a proteína em estudo não tende a desnaturar.

Seguidamente, pode-se tentar purificar o antígeno por IEC com a resina aniônica *Q Sepharose Fast Flow*, utilizando um tampão de lavagem (imidazole 20 mM; pH 9,0) e um tampão de eluição (imidazole 20 mM; NaCl 1 M; pH 9,0). No entanto, para esta cromatografia será necessário definir alguns parâmetros, nomeadamente se será preciso diluir a amostra antes de se aplicar na coluna de cromatografia, bem como os volumes dos tampões a utilizar. Em alternativa também se pode mudar a composição dos tampões de lavagem e de eluição.

### 9º Ensaio - Antígeno purificado por IMAC para posteriormente se conjugar com AuNP

De entre todas as tentativas realizadas para concentrar o antígeno sempre se verificou que a proteína em estudo tende a desnaturar, tornando-se insolúvel, quando se tenta concentrar. De forma a contornar este obstáculo utilizou-se o antígeno em tampão de eluição para a formação dos bionanoconjugados AuNP-Antígeno.

Purificaram-se sete amostras (numeradas de A a G) por IMAC recorrendo a uma resina de ião cobre, com um tampão de lavagem e um tampão de eluição. Os volumes decorrentes de cada purificação foram avaliados por ELISA (**Figura 3.28**).

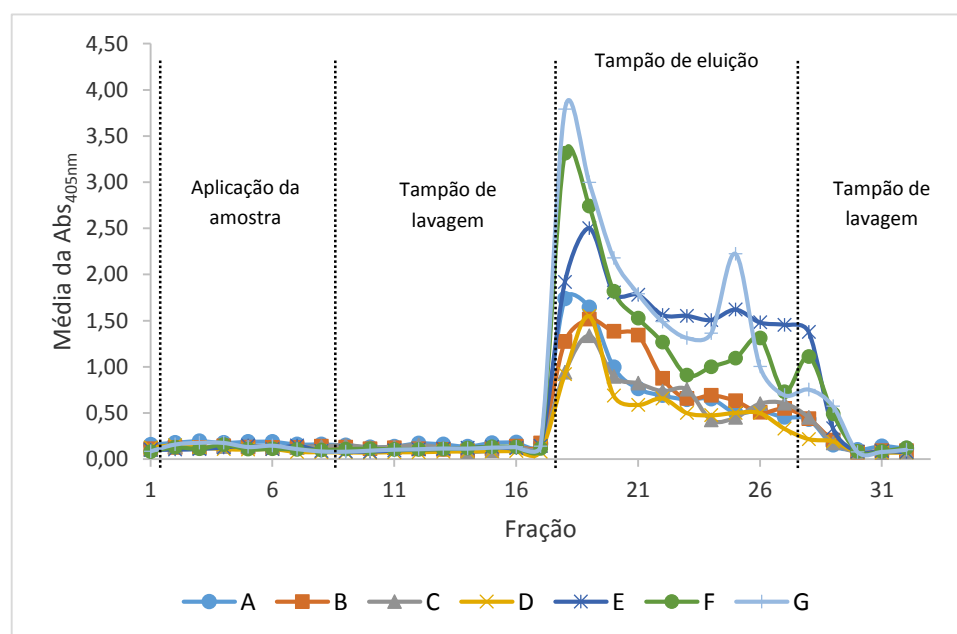


Figura 3.28 Ensaio de ELISA proveniente da purificação do antígeno rsm por IMAC.

Pela análise da **Figura 3.28**, é possível constatar o aumento da absorvância entre as frações 18 a 28, indicativo de que o antígeno foi eluído da coluna pelo tampão de eluição. Para as sete purificações observa-se igualmente que o antígeno foi maioritariamente eluído nas duas/três primeiras frações pelo tampão de eluição. Deste modo, para cada purificação (amostras numeradas de A a G) juntaram-se as frações mais concentradas num *falcon* e as frações mais diluídas noutra *falcon*, tal como se apresenta no **Quadro 3.2**.

*Quadro 3.2 Falcons correspondentes às frações mais concentradas e mais diluídas para as amostras numeradas de A a G.*

<i>Falcon</i>	Amostra	Frações
<b>1</b>	A	18 a 19
<b>2</b>	A	20 a 28
<b>3</b>	B	18 a 21
<b>4</b>	B	22 a 28
<b>5</b>	C	18 a 20
<b>6</b>	C	21 a 28
<b>7</b>	D	18 e 19
<b>8</b>	D	20 a 28
<b>9</b>	E	18 a 20
<b>10</b>	E	21 a 28
<b>11</b>	F	18 e 19
<b>12</b>	F	20 a 28
<b>13</b>	G	18 e 19
<b>14</b>	G	20 a 28

Analisando o gel de SDS-PAGE a 15% apresentado na **Figura 3.29**, podemos constatar a presença do antígeno em todas as frações. Para as frações mais concentradas observam-se bandas muito ténues, com o peso molecular aproximado de 38 kDa, correspondentes a uma proteína contaminante.

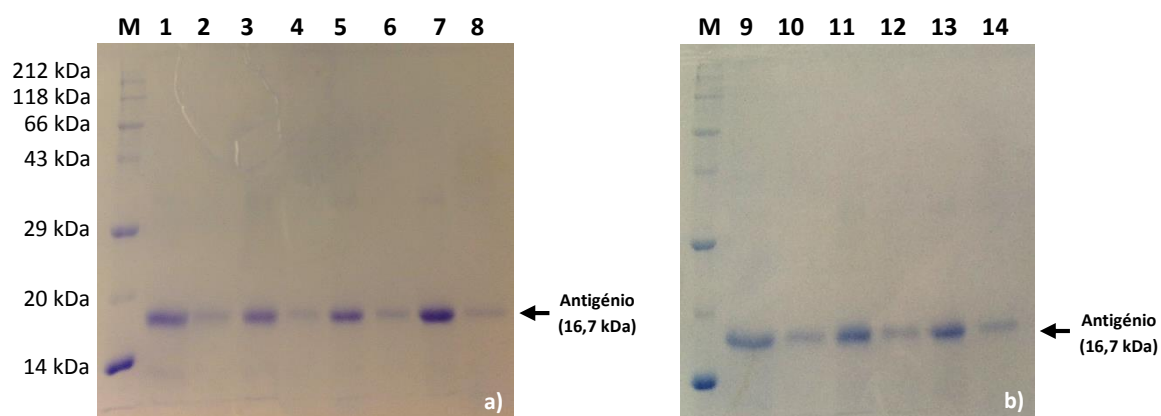


Figura 3.29 Gel de SDS-PAGE a 15%. M - Marcador de pesos moleculares; a) 1 - Amostra A: frações 18 e 19; 2 - Amostra A: frações 20 a 28; 3 - Amostra B: frações 18 a 21; 4 - Amostra B: frações 22 a 28; 5 - Amostra C: frações 18 a 20; 6 - Amostra C: frações 21 a 28; 7 - Amostra D: frações 18 e 19; 8 - Amostra D: frações 20 a 28; b) 9 - Amostra E: frações 18 a 20; 10 - Amostra E: frações 21 a 28; 11 - Amostra F: frações 18 e 19; 12 - Amostra F: frações 20 a 28; 13 - Amostra G: frações 18 e 19; 14 - Amostra G: frações 20 a 28.

De entre as frações mais concentradas escolheu-se aleatoriamente as frações 18 e 19, correspondentes à amostra A, para a formação dos bionanoconjugados AuNP-Antígeno. Pela **Figura 3.29**, quando comparadas as intensidades das bandas referentes ao antígeno com a intensidade das bandas relativa à proteína contaminante com o peso molecular aproximado de 38 kDa, verifica-se que o antígeno apresenta bandas mais intensas, indicativo de que se encontra em maior quantidade que a proteína contaminante. Por este motivo, a presença da proteína contaminante não interferirá na formação dos bionanoconjugados AuNP-Antígeno, uma vez que o antígeno apresenta um grau de pureza suficiente para a conjugação com as AuNP.

Pelo método de BCA, para as frações 18 e 19 da amostra A, verifica-se que o antígeno se apresenta em solução com uma concentração de cerca de 13,11 mg/mL, como se apresenta na **Quadro 3.3** (a reta de calibração encontra-se no **Anexo 5**). As concentrações para as restantes frações encontram-se representadas no **Quadro A.4** no **Anexo 5**.

Quadro 3.3 Concentração de antígeno pelo método de BCA para as frações 18 e 19 correspondentes à amostra A.

Volume (μL)	Concentração (mg/mL)	Concentração para 10 μL (mg/mL)
10	13,51	13,51
10	14,56	14,56
20	24,21	12,10
20	24,53	12,26
Média		13,11



### 3.6 Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro

A síntese de nanopartículas de ouro (AuNP) pelo método de *Turkevich*<sup>31</sup> é bastante reprodutível, visto que em todas as sínteses realizadas se obteve um espectro de UV-vis semelhante, revelando que o diâmetro e a concentração das AuNP eram idênticas. As nanopartículas de ouro apresentam um espectro de UV-vis característico, com absorvância máxima da banda de LSPR centrada a cerca de 520 nm, o que confere à solução uma cor vermelha<sup>83</sup>. Na **Figura 3.30** está representado um espectro de UV-vis obtido tipicamente para uma síntese de AuNP.

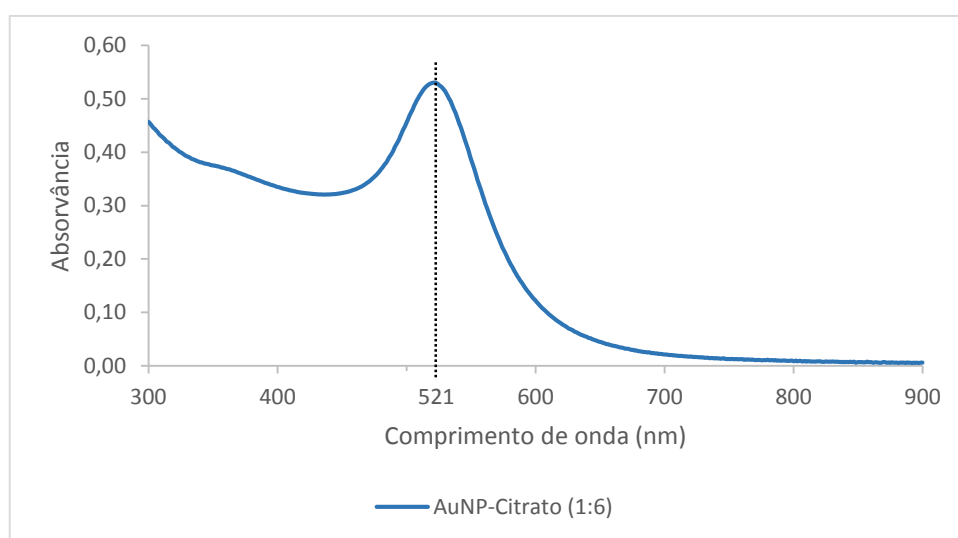


Figura 3.30 Espectro de UV-vis de AuNP com 15 nm de tamanho médio, sintetizadas pelo método de *Turkevich*. A concentração de AuNP nesta solução é de 8,90 nM, com absorvância máxima da LSPR a 521 nm.

O tamanho e a concentração das nanopartículas sintetizadas foi calculado pelo método de *Haiss et al.*<sup>69</sup>, tal como descrito no ponto **2.6.1**. Primeiramente foi necessário calcular o rácio entre absorvância no máximo da banda de LSPR (521 nm) e a absorvância para o comprimento de onda de 450 nm, como se apresenta na **Equação 3.1**.

$$y = \frac{Abs_{521nm}}{Abs_{450nm}} = \frac{0,53}{0,32} = 1,64 \quad \text{Equação 3.1}$$

Substituindo o valor de  $y$  na **Equação 2.2** (ver ponto **2.6.1**) verifica-se que as AuNP sintetizadas apresentam um tamanho médio de 15 nm. Uma vez que a cada valor de diâmetro corresponde um valor de  $\epsilon_{450nm}$  tabelado<sup>69</sup>, é possível calcular a concentração das nanopartículas pela lei de *Lambert-Beer* (**Equação 2.3**, ver ponto **2.6.1**), tendo em conta o fator de diluição (6 vezes diluído). Para esta síntese as nanopartículas de ouro apresentam uma concentração de 8,90 nM.

### 3.7 Funcionalização das nanopartículas de ouro

Com o propósito de melhorar a estabilidade das nanopartículas, o citrato de sódio pode ser substituído por outros ligandos que apresentem maior afinidade para o ouro, relativamente à ligação eletrostática entre o citrato de sódio e as AuNP. Os iões citrato conferem carga negativa à superfície das nanopartículas, o que permite que as AuNP-Citrato sejam estáveis em solução devido à repulsão eletrostática<sup>34</sup>. Todavia, a alteração do pH ou da força iónica do meio envolvente induz a agregação das AuNP devido à diminuição das forças de repulsão existentes entre as mesmas<sup>29</sup>. Este efeito pode ser detetado visualmente, uma vez que se observa uma mudança de cor vermelha (estado coloidal, não agregado) para azul (estado agregado), acompanhado pelo deslocamento da banda de LSPR para comprimentos de onda maiores<sup>46</sup>.

Assim, as AuNP foram funcionalizadas com ácido mercaptoundecanóico (MUA) ou com o pentapéptido CALNN (Cisteína, Alanina, Leucina, Asparagina, Asparagina), com o objetivo de aumentar a estabilidade coloidal das AuNP. Estes dois ligandos, embora com estruturas diferentes, têm grande afinidade para o ouro devido à presença de um grupo tiol, o que permite efetuar uma ligação quasi-covalente com este metal<sup>29,38</sup>. Além de que, promovem a conjugação controlada do antígeno à AuNP funcionalizada, ou seja, evitam as ligações não específicas entre as AuNP e o antígeno<sup>84</sup>.

Selecionaram-se estes ligandos com o intuito de perceber qual dos dois confere maior estabilidade às nanopartículas e por conseguinte qual dos dois permite a formação dos bionanoconjugados mais estáveis e robustos. As razões molares de funcionalização escolhidas para AuNP-MUA (1:5000) e AuNP-CALNN (1:1000) já tinham sido determinadas anteriormente no Bionano@REQUIMTE<sup>85</sup>.

A funcionalização com MUA foi comprovada por espectroscopia de UV-vis, através da análise do desvio da banda de LSPR entre as AuNP não funcionalizadas (revestidas com citrato) e as AuNP funcionalizadas com MUA, tal como ilustra a **Figura 3.31**.

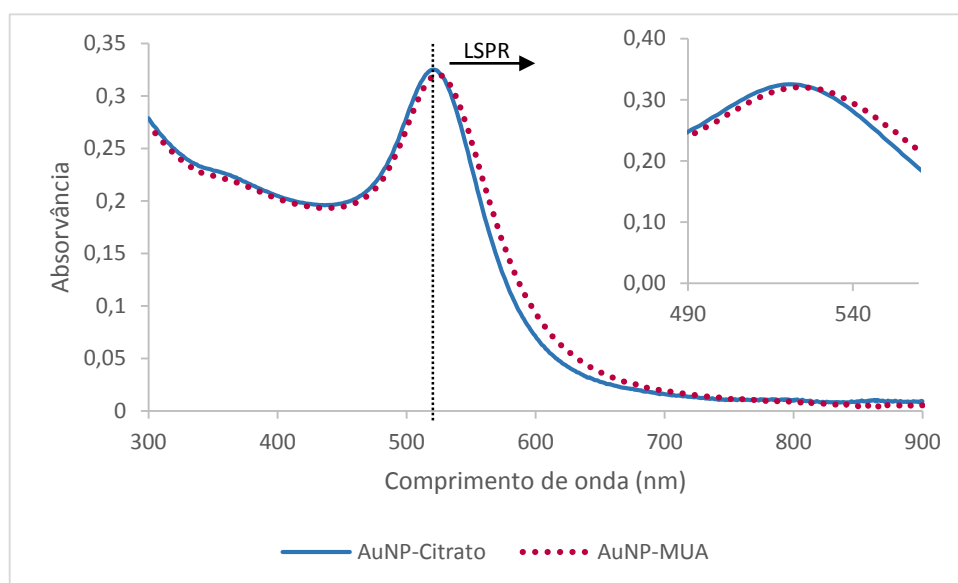


Figura 3.31 Espectro de UV-vis de 1 nM AuNP-Citrato e 1 nM AuNP-MUA

Para as AuNP-CALNN, a funcionalização foi igualmente comprovada espectroscopia de UV-vis, pela análise do desvio da banda de LSPR entre as AuNP-Citrato e as AuNP-CALNN, como se apresenta na **Figura 3.32**.

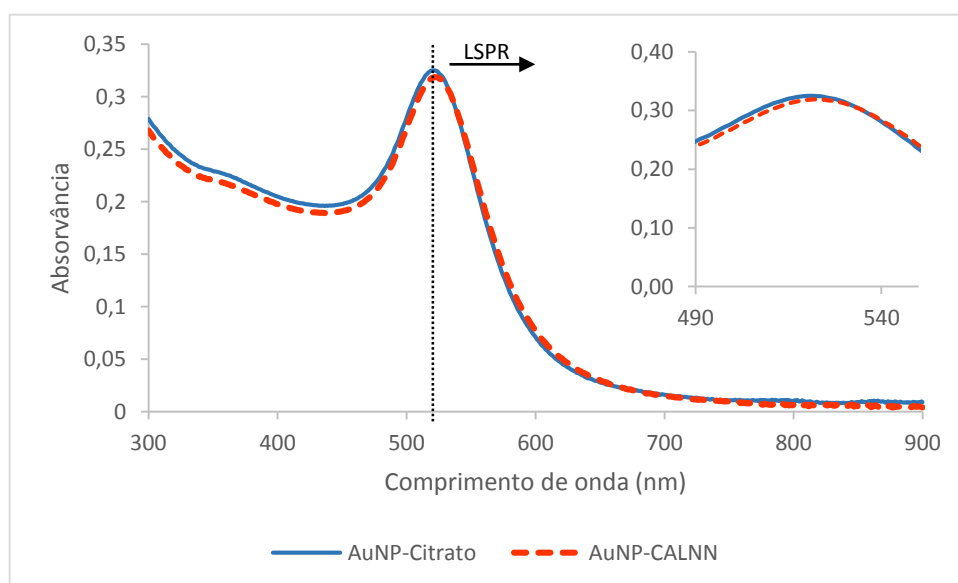


Figura 3.32 Espectro de UV-vis de 1 nM AuNP-Citrato e 1 nM AuNP-CALNN

Após a funcionalização da superfície das nanopartículas de ouro pelos ligandos MUA ou CALNN, observa-se um deslocamento do máximo da banda de LSPR para comprimentos de onda maiores em comparação com o máximo da banda de LSPR das AuNP-Citrato. Este fenómeno pode ser explicado pela alteração do índice de refração do meio envolvente das AuNP, visto que o aumento do índice de refração induz o desvio do máximo da banda de LSPR para comprimentos de onda maiores<sup>86</sup>.

Como está patente no **Quadro 3.4**, as AuNP-MUA apresentam o máximo da banda de LSPR a 524 nm, o que revela um deslocamento de 3 nm em relação à LSPR das AuNP-Citrato (521 nm). Para as AuNP-CALNN, o máximo da banda de LSPR situa-se a 522 nm, verificando-se o deslocamento de 1 nm relativamente às AuNP-Citrato (521 nm).

Quadro 3.4 Máximo da banda de LSPR (nm) para nanopartículas funcionalizadas com diferentes ligandos.

Revestimento	AuNP-Citrato	AuNP-MUA	AuNP-CALNN
LSPR (nm)	521	524	522

Fujiwara *et al.*<sup>86</sup> verificaram o deslocamento do máximo da LSPR para comprimentos de onda maiores, após a funcionalização da superfície das AuNP-Citrato com MUA. Neste estudo pretendiam imobilizar a proteína BSA à superfície de nanopartículas de ouro depositadas num substrato de vidro. Cortez *et al.*<sup>40</sup> observaram o deslocamento de 2 nm do máximo da LSPR, após a funcionalização da superfície das nanopartículas de ouro com CALNN relativamente às AuNP-Citrato, para a formação dos bionanoconjugados AuNP-CALNN-Tirosinase. Atendendo a estes resultados, pode-se concluir que a funcionalização das AuNP com os ligandos MUA ou CALNN foi bem-sucedida.

### 3.8 Formação dos bionanoconjugados AuNP-Antigénio

A formação dos bionanoconjugados AuNP-Antigénio foi comprovada por eletroforese em gel de agarose. Esta técnica é simples e amplamente utilizada na caracterização e purificação de sistemas biológicos. Na presença de um campo elétrico, as partículas – como colóides, DNA, proteínas e conjugados – serão separadas, numa matriz porosa, de acordo com a sua mobilidade eletroforética, sendo que a mobilidade (distância/(campo elétrico x tempo)) depende do tamanho e da carga das partículas<sup>56,87</sup>. Relativamente aos bionanoconjugados, a mobilidade eletroforética é determinada pela forma das nanopartículas, bem como por alterações de carga à superfície. Assim, a cor branca da agarose é ideal para visualizar a migração dos bionanoconjugados que apresentam cor vermelha, evitando assim a necessidade de coloração adicional do gel, tal como é o caso para o gel de SDS-PAGE.

Por eletroforese em gel de agarose foi possível inferir qual dos ligandos é o mais adequado à formação dos bionanoconjugados, comprovar a formação dos mesmos e determinar a razão molar de antigénio mais indicada para a conjugação, ou seja, as moléculas de antigénio necessárias por cada AuNP funcionalizada em solução, de forma a se obter uma coroa compacta de antigénio em torno da

AuNP. Os bionanoconjugados estudados foram: AuNP-MUA-Antigénio, AuNP-MUA-EDC/NHS-Antigénio e AuNP-CALNN-Antigénio.

### 3.8.1 AuNP-MUA-Antigénio

Diferentes razões molares de antigénio, de 0 a 1200, foram conjugadas com a solução de AuNP previamente funcionalizada com MUA. Os bionanoconjugados foram concentrados por centrifugação e avaliados por eletroforese em gel de agarose a 0,3% (**Figura 3.33**). O gel de agarose apresentado é representativo de um triplicado, tendo-se obtido resultados semelhantes em todos os três ensaios.

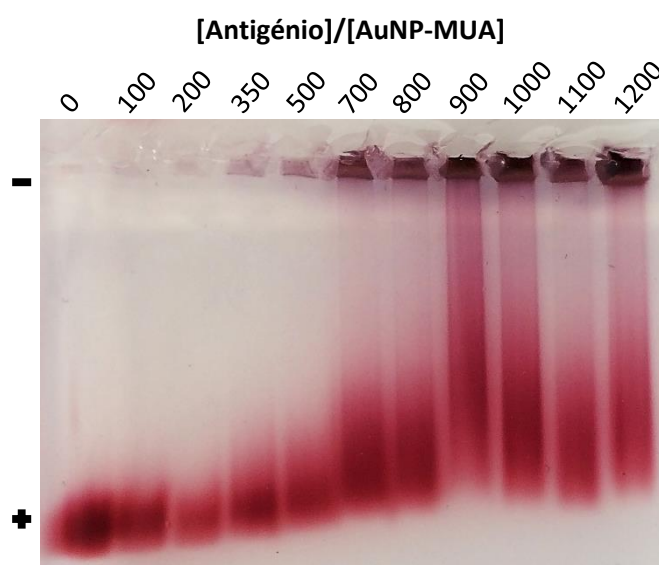


Figura 3.33 Eletroforese em gel de agarose a 0,3% para AuNP-MUA a 5,19 nM com razões molares de antigénio de 0 a 1200, por ordem crescente. Representação da polaridade dos eletrodos – (ânodo) e + (cátodo).

De acordo com a **Figura 3.33**, para a razão molar de 0 observa-se uma banda bem definida correspondente a AuNP-MUA. A funcionalização com este ligando confere carga negativa às nanopartículas, devido à presença de grupos  $\text{COO}^-$  na sua extremidade e como tal, na presença de um campo elétrico, as AuNP-MUA com carga negativa deslocam-se para o polo positivo.

Para as razões molares de 100 e 200 observam-se igualmente bandas bem definidas, bem como a diminuição da distância de migração. Quanto às razões molares de 350 e 500 verifica-se a diminuição crescente da distância de migração, embora se observe um ligeiro arrastamento e alguma agregação nos poços. À medida que a razão molar de antigénio aumenta, há um cancelamento das cargas negativas à superfície das AuNP-MUA, devido à ligação eletrostática entre o antigénio e os grupos  $\text{COO}^-$  do MUA, e por conseguinte a distância de migração diminui.

A partir da razão molar de 700 a 1200 a distância de migração estabiliza, indicativo da formação dos bionanoconjugados. Contudo, a migração dos bionanoconjugados não é uniforme, uma vez que

se verifica a presença de arrastamento ao longo da matriz porosa, o que revela diferenças nas cargas das partículas. Possivelmente cada nanopartícula não se encontra totalmente revestida de antígeno. Para as razões molares mais elevadas, nomeadamente 700 a 1200, a conjugação das AuNP com o antígeno altera a estabilidade da solução coloidal, uma vez que se observa elevada retenção dos bionanoconjugados nos poços, comparativamente às razões mais baixas.

A **Figura 3.34** traduz a mobilidade eletroforética com o aumento da razão molar de antígeno conjugado às AuNP-MUA. Deste modo, verifica-se a diminuição da mobilidade eletroforética até cerca de  $-2 \mu\text{m cm/Vs}$  para as razões molares de antígeno de 0 a 500. Os resultados obtidos comprovam a formação dos bionanoconjugados, tal como demonstra a **Figura 3.33**. Para as razões molares de 700 até 1200, as diferenças de mobilidade eletroforética são muito próximas, em torno de  $-1,95 \mu\text{m cm/Vs}$ . Este resultado demonstra que a distância de migração estabilizou, o que denota a formação dos bionanoconjugados, tal como se verificou na **Figura 3.33**.

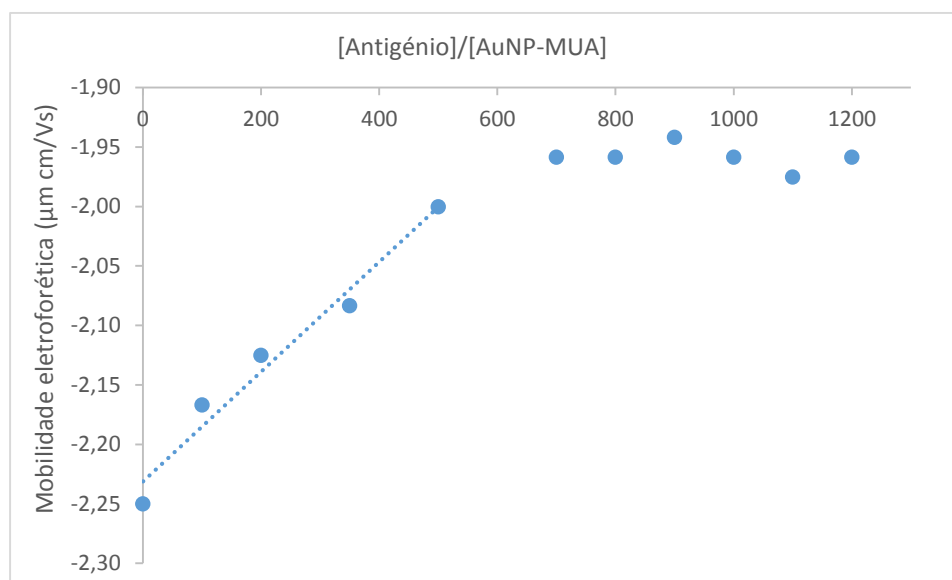


Figura 3.34 Mobilidade eletroforética ( $\mu$ ) para os bionanoconjugados AuNP-MUA-Antígeno calculada a partir das distâncias de migração pelo gel de eletroforese a 0,3%.

Com base nos resultados obtidos, determinou-se que a razão molar  $[\text{Antígeno}]/[\text{AuNP-MUA}]$  ideal para a formação dos bionanoconjugados é de 1:500. A esta razão é possível garantir a existência de uma camada de antígeno a revestir a superfície das nanopartículas de ouro, embora se verifique um ligeiro arrastamento da banda respetiva no gel de agarose e uma agregação mínima no poço, comparativamente com as razões molares mais altas. A conjugação também foi comprovada por espectroscopia de UV-vis pela comparação do deslocamento da banda de LSPR das AuNP-MUA e dos bionanoconjugados AuNP-MUA-Antígeno (1:500), **Figura 3.35**.

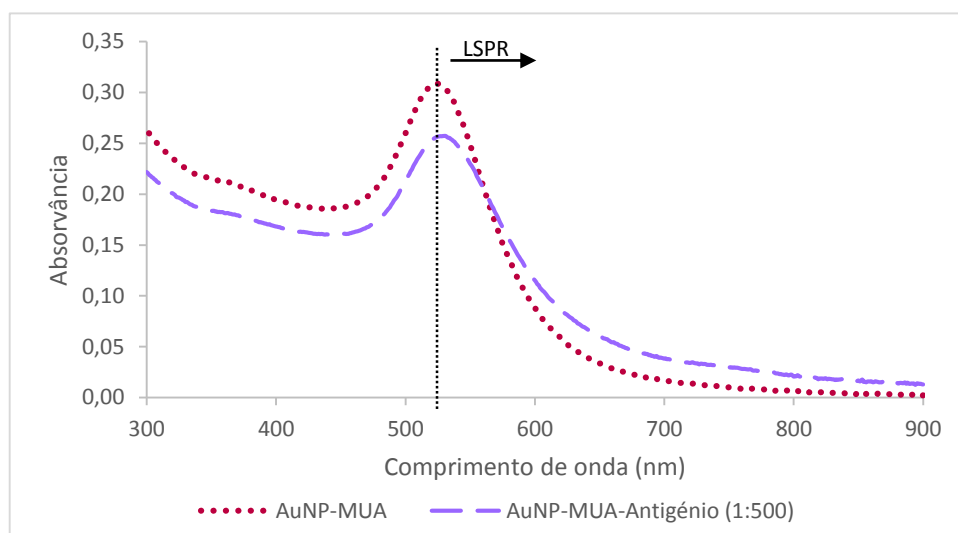


Figura 3.35 Espectro de UV-vis para 1 nM AuNP-MUA e 1 nM AuNP-MUA-Antigénio (1:500). Deslocamento do máximo da banda de LSPR para comprimentos de onda maiores para a conjugação das AuNP-MUA com o antigénio.

Como ilustrado na **Figura 3.35** e no **Quadro 3.5** os bionanoconjugados apresentam o máximo da LSPR a 530 nm, o que indica um deslocamento de 6 nm em relação à LSPR das AuNP-MUA. Este deslocamento corresponde a alterações no índice de refração do meio envolvente das AuNP, o que evidência a conjugação do antigénio rsm com as AuNP-MUA. Nota-se igualmente alguma agregação evidenciada pela diminuição da intensidade da LSPR e pelo aumento dos valores de absorvância a 600-700 nm. Esta ligeira agregação é comum em bionanoconjugados, sendo que o gel de agarose permite separar estas formas agregadas das formas mais solúveis, já que as primeiras ficam retidas no poço.

Quadro 3.5 Máximo da banda de LSPR (nm) para AuNP-MUA e AuNP-MUA-Antigénio (1:500).

Revestimento	AuNP-MUA	AuNP-MUA-Antigénio (1:500)
LSPR (nm)	524	530

### 3.8.2 AuNP-MUA-EDC/NHS-Antigénio

O antigénio foi covalentemente ligado às nanopartículas funcionalizadas com MUA, com o propósito de verificar se se obtinham melhores resultados na conjugação. A ligação covalente foi efetuada pela reação do antigénio com os grupos terminais  $\text{COO}^-$  das AuNP-MUA pelos agentes de reticulação EDC/NHS. Adicionaram-se diferentes razões molares de antigénio, de 0 a 1300, a uma solução de AuNP-MUA-EDC/NHS. Os bionanoconjugados foram concentrados por centrifugação e avaliados por eletroforese em gel de agarose a 0,3% (**Figura 3.36**).

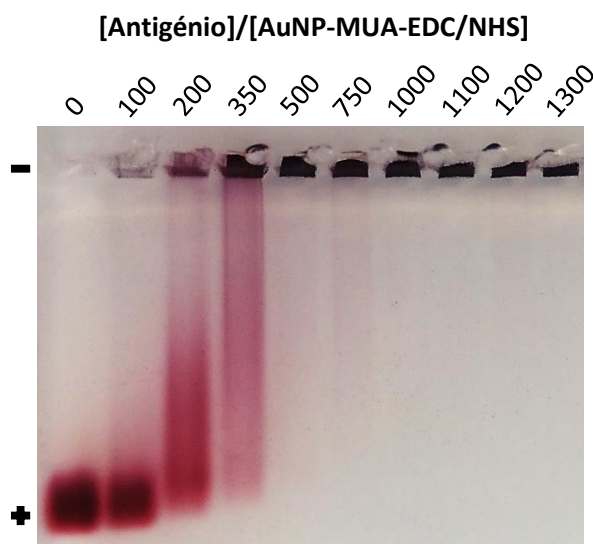


Figura 3.36 Eletroforese em gel de agarose a 0,3% para AuNP-MUA-EDC/NHS a 5,19 nM com razões molares de antígeno de 0 a 1300, por ordem crescente. Representação da polaridade dos eletrodos – (ânodo) e + (cátodo).

Para a razão molar 0, observa-se uma banda bem definida correspondente a AuNP-MUA-EDC/NHS. A ativação dos grupos  $\text{COO}^-$  na extremidade C-terminal do MUA pelo NHS, confere carga negativa às nanopartículas e como tal, na presença de um campo elétrico estas deslocam-se em direção ao polo positivo.

Para as razões molares de 100 a 350, verifica-se o decréscimo da distância de migração em comparação com a razão molar de 0, o que revela que o antígeno se ligou covalentemente às AuNP-MUA-EDC/NHS. Porém observa-se agregação nos poços, indicativo de que houve retenção dos bionanoconjugados. A visualização de arrastamento ao longo da matriz porosa, maioritariamente nas razões molares de 200 e 350, permite inferir diferenças nas cargas das nanopartículas. Para as razões molares entre 500 e 1300, os bionanoconjugados AuNP-MUA-EDC/NHS-Antígeno encontram-se retidos nos poços, não migrando ao longo da matriz porosa, o que mostra a sua completa agregação.

A **Figura 3.37** apresenta a mobilidade eletroforética para os bionanoconjugados AuNP-MUA-EDC/NHS-Antígeno. Para as razões molares de 0 a 350, é observável a diminuição da mobilidade eletroforética até  $-1,9 \mu\text{m cm/Vs}$ , indicativo de que as AuNP-MUA-EDC/NHS se encontram revestidas com o antígeno. Para as razões molares superiores, nomeadamente de 500 a 1300, a mobilidade eletroforética é nula pois não houve migração dos bionanoconjugados, uma vez que estes ficaram retidos nos poços, tal como se verificou na **Figura 3.36**.



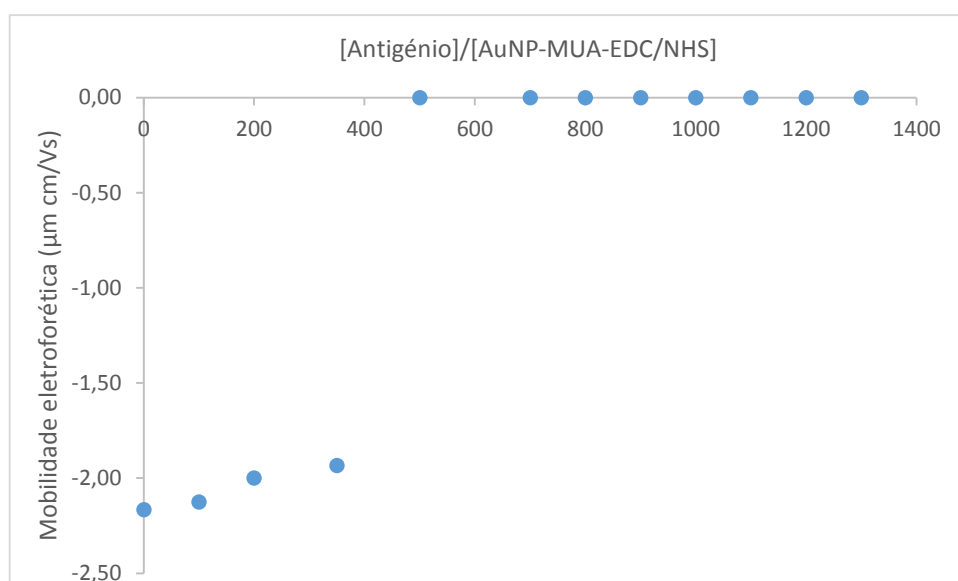


Figura 3.37 Mobilidade eletroforética ( $\mu$ ) para os bionanoconjugados AuNP-MUA-EDC/NHS-Antígeno calculada a partir das distâncias de migração pelo gel de eletroforese a 0,3%.

De acordo com os resultados obtidos, é possível inferir que os agentes de reticulação EDC/NHS não permitiram formar bionanoconjugados AuNP-MUA-EDC/NHS-Antígeno estáveis. Quando comparadas as Figuras 3.33 e 3.36, a retenção dos bionanoconjugados nos poços é mais notória para os bionanoconjugados AuNP-MUA-EDC/NHS-Antígeno (a partir da razão molar de 200) do que para os bionanoconjugados AuNP-MUA-Antígeno (a partir da razão molar de 700). Na presença de EDC/NHS, para razão molar de 500 até 1300 a mobilidade eletroforética é nula, o que permite inferir que a ligação covalente não favorece a conjugação do antígeno à superfície das nanopartículas. De acordo com Cortez *et al.*<sup>40</sup> a ligação eletrostática é preferencial à ligação covalente, pois a ligação covalente pode afetar o *folding* das proteínas. Além de que, a adição do antígeno pode afetar a estabilidade da solução coloidal, promovendo a agregação das partículas.

Tal como na conjugação do antígeno com AuNP-MUA, seria expetável que com o aumento da razão molar de antígeno a mobilidade eletroforética estabilizasse, o que significava que cada nanopartícula estava totalmente revestidas com o antígeno rsm.

### 3.8.3 AuNP-CALNN-Antígeno

Para os bionanoconjugados AuNP-CALNN-Antígeno não se obtiveram quaisquer resultados por eletroforese em gel de agarose a 3%. Possivelmente as nanopartículas de ouro não foram corretamente funcionalizadas com CALNN e consequentemente não se verificou a formação dos bionanoconjugados. Para o presente estudo apenas se realizou um ensaio para os bionanoconjugados AuNP-CALNN-Antígeno, pelo que no futuro será necessário repetir este ensaio nas condições

experimentais mencionadas no ponto **2.8.3**, com o intuito de verificar a formação dos bionanoconjugados. Em alternativa podem-se testar outras condições experimentais, como por exemplo utilizar razões maiores de CALNN de forma a verificar se existem melhorias na conjugação das AuNP-CALNN com o antígeno.

Estudos evidenciam que o pentapéptido CALNN permite formar bionanoconjugados estáveis. Cortez *et al.*<sup>40</sup> verificaram que as AuNP-CALNN podem ser uma plataforma adequada para a imobilização da tirosinase, uma vez que a formação dos bionanoconjugados AuNP-CALNN-Tirosinase permitiu aumentar a atividade da enzima comparativamente à enzima na forma livre.

### 3.9 Estabilidade coloidal das nanopartículas de ouro e dos bionanoconjugados

A estabilidade coloidal das AuNP e dos bionanoconjugados foi determinada pela variação da força iónica e do pH do meio. Após a análise por espectroscopia de UV-vis, calculou-se a razão de agregação que resulta do quociente entre os valores de absorvância para o comprimento de onda da banda típica de agregação das AuNP (cerca de 600 nm), e os valores de absorvância da banda de LSPR característica de AuNP com diâmetro entre 13 e 20 nm<sup>31,46</sup>. Para este estudo a razão de agregação foi determinada pelo quociente  $Abs_{600nm}/Abs_{SPR}$ <sup>46</sup>. Este quociente fornece uma grandeza relativa para a agregação das AuNP funcionalizadas e dos bionanoconjugados em função da concentração de sal ou do pH do meio. Pelo ponto de meia agregação é possível estimar a concentração mínima de sal ou o valor de pH que provoca agregação das AuNP ou dos bionanoconjugados.

O estudo incidiu sobre quatro soluções distintas: AuNP-Citrato, AuNP-MUA, AuNP-CALNN e nanopartículas funcionalizadas com MUA e conjugadas com antígeno para a razão molar de 1:500 (AuNP-MUA-Antígeno 1:500).

#### 3.9.1 Variação da força iónica

Pela variação da força iónica entre 0 e 1 M de NaCl foi possível avaliar a estabilidade das AuNP com diferentes ligandos e dos bionanoconjugados (**Figura 3.38**).

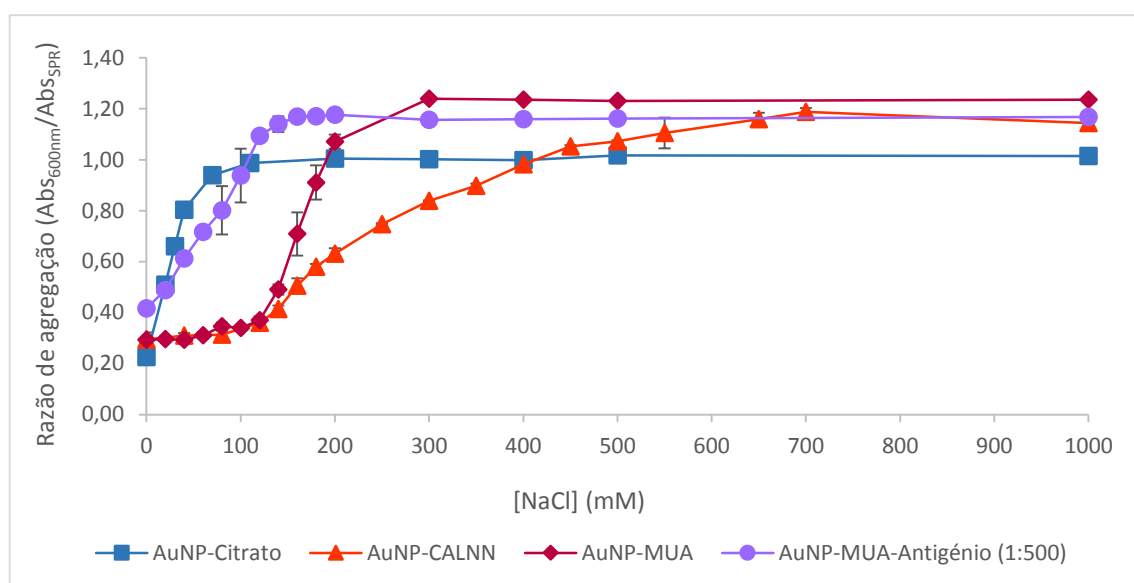


Figura 3.38 Razão de agregação das AuNP-Citrato, AuNP-CALNN, AuNP-MUA e dos bionanoconjugados em função da concentração de NaCl.

Atendendo à **Figura 3.38** verifica-se que o perfil de agregação é distinto para as quatro soluções em estudo. Para 0 M de NaCl a razão de agregação é igual a 0,23 para as AuNP-Citrato. Como a solução não se encontra agregada, apresentando um espectro de UV-vis característico com uma banda de LSPR simétrica e centrada a 520 nm, este valor é assim indicativo de uma solução coloidal AuNP-Citrato não agregada. Com a adição de sal, verifica-se que o ponto de meia agregação ocorre aproximadamente a 30 mM de NaCl, sendo que as AuNP-Citrato ficam totalmente agregadas a 100 mM de NaCl, mantendo-se assim para concentrações de sal superiores. Quando a superfície das AuNP é revestida pelo pentapéptido CALNN verifica-se que o ponto de meia agregação ocorre aproximadamente a 250 mM de sal. A partir de 550 mM de NaCl as AuNP-CALNN agregam por completo, mantendo-se assim para concentrações de sal superiores. O ponto de meia agregação para as AuNP-MUA ocorre a 160 mM de NaCl. Para a concentração de 300 mM de NaCl as AuNP-MUA agregam por completo, mantendo-se assim para concentrações de sal superiores.

Quanto aos bionanoconjugados AuNP-MUA-Antigénio é observável que o ponto de meia agregação ocorre sensivelmente a 60 mM de NaCl. A partir de 140 mM de NaCl os bionanoconjugados encontram-se totalmente agregados, permanecendo assim para concentrações de NaCl superiores. Com o aumento da força iónica do meio envolvente, os iões  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  competem pelas moléculas de água responsáveis pela solvatação dos bionanoconjugados AuNP-MUA-Antigénio. Deste modo, os bionanoconjugados ficam menos solvatados e ficam expostos aos iões  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  no cancelamento dos resíduos carregados constituintes do antigénio, o que promove a agregação. A diferença de comportamento entre AuNP-MUA e AuNP-MUA-Antigénio, pela variação da força iónica do meio envolvente, denota a presença do antigénio à superfície das AuNP, uma vez que o ponto de meia

agregação dos bionanoconjugados (60 mM) ocorre a um valor de NaCl mais baixo do que das AuNP-MUA não conjugadas (160 mM).

O **Quadro 3.6** traduz a concentração de NaCl à qual se verificou o ponto de meia agregação e de agregação para as quatro soluções em estudo. Com o aumento da força iônica do meio envolvente e de entre os três ligandos estudados, verifica-se que o CALNN confere maior estabilidade às AuNP em solução, uma vez que o ponto de meia de agregação é atingido a concentrações de NaCl superiores (250 mM) comparativamente aos restantes ligandos. Também se verifica que o ponto de agregação para as AuNP-CALNN ocorre a concentrações de sal superiores (550 mM) em comparação com os outros ligandos. Deste modo, é possível inferir que o CALNN confere maior estabilidade às AuNP, uma vez que permite formar uma camada mais compacta em torno das nanopartículas, impedindo que as AuNP-CALNN agreguem a forças iônicas mais baixas, comparativamente as AuNP-Citrato e AuNP-MUA. A funcionalização com ligandos que contêm grupos carboxilo confere estabilidade às partículas por longos períodos de tempo e a elevadas concentrações de sal<sup>34</sup>.

Em solução aquosa, os iões Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> interagem com as cargas superficiais das nanopartículas, destabilizando-as. Assim, o aumento da força iônica enfraquece as forças de repulsão entre as partículas, promovendo a sua agregação<sup>88,89</sup>.

*Quadro 3.6 Concentrações de NaCl às quais foram atingidos os pontos de meia agregação e de agregação para as AuNP com diferentes ligandos e para os bionanoconjugados.*

Revestimento	AuNP-Citrato	AuNP-CALNN	AuNP-MUA	AuNP-MUA-Antigénio (1:500)
Ponto de meia agregação	30 mM	250 mM	160 mM	60 mM
Ponto de agregação	100 mM	550 mM	300 mM	140 mM

### 3.9.2 Variação do pH do meio

Pela variação do pH do meio (entre 2 e 10) foi possível avaliar a estabilidade das AuNP com diferentes ligandos e dos bionanoconjugados, tal como representado na **Figura 3.39**.

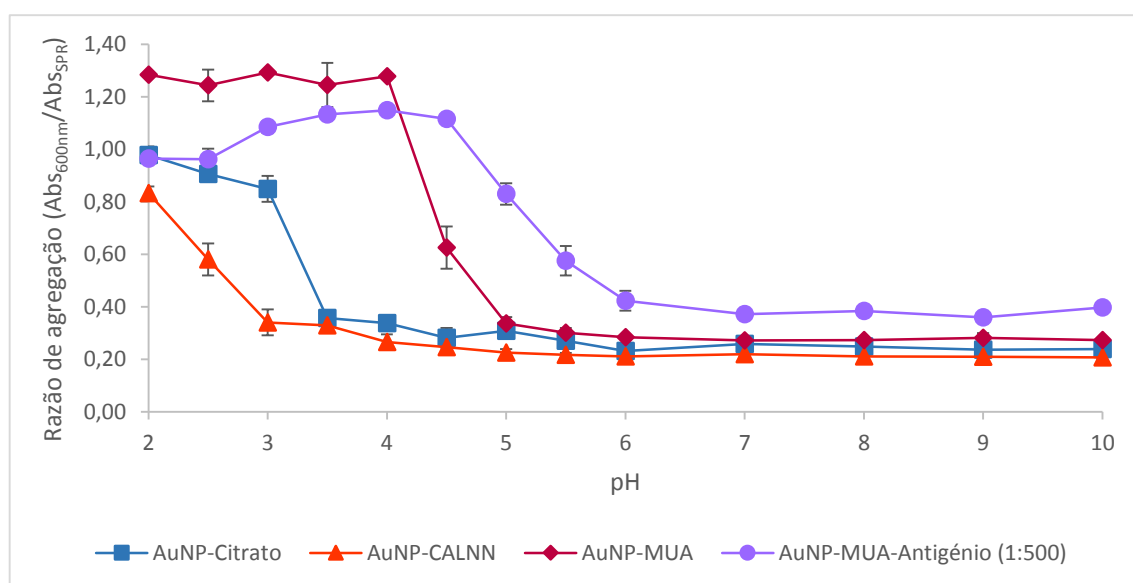


Figura 3.39 Razão de agregação das AuNP-Citrato, AuNP-CALNN, AuNP-MUA e dos bionanoconjugados em função da concentração de NaCl.

O pH de uma solução de AuNP-Citrato após a síntese é aproximadamente igual a 6. Verifica-se que para valores de pH entre 6 e 10 as quatro soluções em estudo mantêm-se estáveis, o que permite inferir que para valores de pH básicos não ocorre agregação das AuNP nem dos bionanoconjugados.

Para valores de pH ácidos, constata-se que o ponto de meia agregação das nanopartículas ocorre a valores de pH próximos dos valores de  $pK_a$  das moléculas utilizadas para a funcionalização. Desta forma, para as AuNP-Citrato verifica-se que o ponto de meia agregação ocorre sensivelmente a pH 3, valor aproximado ao  $pK_a$  do citrato de sódio (3,13)<sup>90</sup>, sendo que para pH 2 as AuNP-Citrato agregam por completo. Relativamente às nanopartículas funcionalizadas com CALNN, observa-se que o ponto de meia agregação é atingido a pH 2,5, um valor inferior ao anteriormente obtido de 3,4<sup>40</sup>, sendo o  $pK_a$  do grupo carboxilo do CALNN de cerca de 4<sup>38</sup>. A solução de AuNP-CALNN utilizada para este ensaio não foi a mesma solução utilizada para o ensaio de variação da força iónica do meio envolvente, pelo que possivelmente as AuNP não foram corretamente funcionalizadas com CALNN, uma vez que apresentam o ponto de agregação (pH 2,5) relativamente próximo do ponto de agregação das AuNP-Citrato (pH 3). As AuNP-CALNN ficam totalmente agregadas a pH 2. Enquanto para as AuNP-MUA o ponto de meia agregação ocorre aproximadamente a pH 4,5, que mais uma vez se encontra próximo do valor de  $pK_a$  do MUA quando este se encontra imobilizado numa superfície de ouro (4,8)<sup>36</sup>. Para o valor de pH 4 as AuNP-MUA agregam por completo, mantendo-se assim para valores de pH mais ácidos. Ao valor de  $pK_a$  dos grupos protonáveis expostos das moléculas que funcionalizam as AuNP, os iões  $H^+$  ligam-se aos grupos funcionais presentes à superfície das nanopartículas com carga negativa, reduzindo a repulsão eletrostática entre as partículas e conduzindo à agregação das mesmas<sup>88</sup>.

Os bionanoconjugados apresentam um comportamento distinto das AuNP-MUA, uma vez que o ponto de meia agregação ocorre a pH igual a 5. A este valor de pH é possível inferir que provavelmente ocorre anulação das cargas dos resíduos carregados constituintes do antígeno, o que promove a aproximação das nanopartículas, agregando-as<sup>88</sup>. Os bionanoconjugados agregam por completo a pH 4,5, mantendo-se assim para valores de pH mais ácidos. A diferença de comportamento pela variação do pH do meio envolvente demonstra a presença do antígeno à superfície das nanopartículas, uma vez os bionanoconjugados apresentam uma distribuição de carga superficial distinta relativamente às AuNP-MUA, o que leva à sua agregação a um valor de pH diferente das AuNP-MUA não conjugadas<sup>40</sup>.

No **Quadro 3.7** apresentam-se os valores de pH para os quais foram atingidos os pontos de meia agregação e de agregação para as AuNP com diferentes revestimentos, bem como para os bionanoconjugados.

*Quadro 3.7 Valores de pH aos quais foram atingidos os pontos de meia agregação e de agregação para as AuNP com diferentes ligandos e para os bionanoconjugados.*

Revestimento	AuNP-Citrato	AuNP-CALNN	AuNP-MUA	AuNP-MUA-Antígeno (1:500)
Ponto de meia agregação	pH 3,0	pH 2,5	pH 4,5	pH 5,0
Ponto de agregação	pH 2,0	pH 2,0	pH 4	pH 4,5

## 4 CONCLUSÃO

### 4.1 Síntese do trabalho

No presente estudo foi possível otimizar a expressão, produção e purificação do antígeno rsm, bem como formar os bionanoconjugados AuNP-Antígeno, para futuramente se desenvolver um TDR da PPC.

Inicialmente foi necessário clonar o vetor de expressão pLATE31 que continha a sequência codificante para o antígeno em *E. coli XJb (DE3)*, uma vez que se pretendia obter maior quantidade de antígeno. Depois de isolar o DNA plasmídico, as células de *E. coli XJb (DE3)* foram tornadas competentes pelo método de cloreto de cálcio e transformadas pelo método do choque térmico, tendo-se verificado que o tempo de incubação de 2 min, a 42 °C, foi suficiente para obter colônias transformadas.

Quando comparados os ensaios de expressão e produção do antígeno em *E. coli BL21 (DE3)* e em *E. coli XJb (DE3)*, verificou-se que para a estirpe *XJb (DE3)* se obteve maior quantidade de antígeno.

Experimentaram técnicas alternativas para purificar e concentrar a proteína em estudo. Por IMAC com recurso a uma resina de íão níquel, foi possível constatar que o aumento do volume de tampão de eluição (10 mL) permitiu obter maior quantidade de antígeno. Enquanto noutro ensaio, recorrendo à IMAC utilizando quatro íões metálicos diferentes ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$ ) se verificou que através do íão cobre se obteve maior quantidade de antígeno, comparativamente aos outros três íões metálicos. Porém, quando se tentou concentrar o antígeno com acetona, PEG 8000 e/ou pelo sistema de ultraconcentração *Amicon*, verificou-se que a proteína em estudo tende a desnaturar, tornando-se insolúvel, o que demonstrou que estes métodos não foram os mais adequados para concentrar e manter a solubilidade do antígeno.

De entre as frações mais concentradas selecionou-se aleatoriamente as frações 18 e 19, correspondentes à amostra A, para a formação dos bionanoconjugados. Pelo método de BCA verificou-se que o antígeno se apresentava em solução com uma concentração de cerca de 13,11 mg/mL.

Pelo método de *Turkevich* foi possível sintetizar AuNP de 15 nm de diâmetro, este método é fácil de reproduzir, visto que em todas as sínteses realizadas se obtiveram AuNP com tamanhos e concentrações semelhantes.

Por eletroforese em gel de agarose a 0,3%, verificou-se que o ligando MUA permitiu formar bionanoconjugados AuNP-MUA-Antígeno promissores para aplicação no TDR. Para a razão molar

[Antigénio]/[AuNP-MUA] de 1:500 foi possível garantir a existência de uma camada de antigénio a revestir a superfície das AuNP.

A formação dos bionanoconjugados AuNP-MUA-Antigénio foi igualmente comprovada por espectroscopia de UV-vis, no qual se verificou o deslocamento de 6 nm do máximo da banda de LSPR dos bionanoconjugados (530 nm) em relação ao máximo da banda de LSPR das AuNP-MUA (524 nm).

Através dos ensaios de estabilidade coloidal das AuNP e dos bionanoconjugados AuNP-MUA-Antigénio pela variação da força iónica e do pH do meio envolvente, verificou-se que os bionanoconjugados apresentavam um comportamento distinto das AuNP-MUA, o que confirmou a formação dos bionanoconjugados

Pela variação da força iónica, entre 0 e 1 M de NaCl, foi possível constatar que o ponto de meia agregação para os bionanoconjugados foi atingido sensivelmente a 60 mM de NaCl, sendo que a partir de 140 mM de sal os bionanoconjugados agregavam por completo, permanecendo assim para concentrações de NaCl superiores. Pela variação do pH do meio (entre pH 2 e 10), observou-se que o ponto de meia agregação para os bionanoconjugados foi atingido a pH igual a 5. Para o valor de pH 4,5 os bionanoconjugados agregavam por completo, mantendo-se assim para valores de pH mais ácidos.

Em conclusão, o projeto desenvolvimento deu um grande contributo para futuros estudos no desenvolvimento do TDR para o diagnóstico da PPC.

## 4.2 Perspetivas futuras

Futuramente nesta dissertação podem ser aplicadas diferentes estratégias com o intuito de obter melhores resultados.

Para a purificação do antigénio por IMAC com a resina de ião cobre, em alternativa ao uso da seringa poder-se-á acoplar a coluna de cromatografia a um sistema de cromatografia líquida rápida de proteína e aplicar um gradiente contínuo de imidazole de 0 a 500 mM.

Após a purificação do antigénio por IMAC com resina de ião cobre, também se poderá dialisar a amostra numa fita de diálise contra tampão imidazole a 20 mM, pH 9,0 ou usar uma coluna de dessalinização. Este passo possivelmente permitirá eliminar os sais presentes em solução que podem competir com o antigénio na ligação à coluna aniónica *Q Sepharose Fast Flow*. Para a cromatografia de troca iónica, será necessário definir os volumes dos tampões a utilizar, bem como se será necessário



diluir o antígeno antes de o mesmo ser aplicado na coluna de cromatografia. Em alternativa também se poderá experimentar outros tampões.

A caracterização dos bionanoconjugados AuNP-MUA-Antígeno poderá ser complementada por técnicas de dispersão de luz tais como potencial zeta e dispersão de luz dinâmica. O potencial zeta mede a carga superficial das nanopartículas e por conseguinte indica o grau de revestimento da superfície das nanopartículas pelo antígeno. Enquanto a dispersão de luz dinâmica determina o diâmetro hidrodinâmico dos bionanoconjugados, esta informação pode ser correlacionada com a quantidade de antígeno que reveste a superfície das AuNP, visto que o diâmetro do bionanoconjugado aumenta com a ligação de quantidades crescentes do antígeno.

Com o intuito de verificar se existem melhorias na conjugação do antígeno com as AuNP-MUA-EDC/NHS podem ser testadas diferentes concentrações dos agentes de reticulação EDC e NHS.

Para os bionanoconjugados AuNP-CALNN-Antígeno, será necessário repetir o ensaio nas condições definidas neste estudo, uma vez que não se obtiveram resultados. Em alternativa, também se poderá utilizar razões maiores de CALNN de forma a verificar se existem melhorias na conjugação das AuNP-CALNN com o antígeno.

Também se poderá experimentar conjugar o antígeno com AuNP de 50 nm de diâmetro, uma vez que estas apresentam uma intensidade de cor cerca de 4 vezes superior à intensidade de cor das AuNP de 15 nm utilizadas neste estudo, pelo que possivelmente permitirá melhorar a detecção de anticorpos *anti-P. jirovecii*.

**Página em Branco**

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Miller, R. F. & Doffman, S. R. in *Manson's Tropical Infectious Diseases* 459–467 (Elsevier, 2014).
2. Esteves, F., Antunes, F. & Matos, O. Pneumocystis e pneumocistose: O agente patogénico e a doença (105 anos de investigação). *Rev. Port. Doenças Infeciosas* **10**, 16–22 (2014).
3. Tasaka, S. & Tokuda, H. Pneumocystis jirovecii pneumonia in non-HIV-infected patients in the era of novel immunosuppressive therapies. *J. Infect. Chemother. Off. J. Japan Soc. Chemother.* **18**, 793–806 (2012).
4. Catherinot, E. *et al.* Pneumocystis jirovecii Pneumonia. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **24**, 107–138 (2010).
5. Krajicek, B. J., Thomas, C. F. & Limper, A. H. Pneumocystis pneumonia: current concepts in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Clin. Chest Med.* **30**, 265–278 (2009).
6. Lu, J.-J. & Lee, C.-H. Pneumocystis pneumonia. *J. Formos. Med. Assoc.* **107**, 830–42 (2008).
7. Souza, W. De & Benchimol, M. Basic biology of *Pneumocystis carinii*: A mini review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **100**, 903–908 (2005).
8. Stringer, J. R., Beard, C. B., Miller, R. F. & Wakefield, A. E. A new name for *Pneumocystis* from humans and new perspectives on the host-pathogen relationship. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 891–896 (2002).
9. *Pneumocystis jirovecii*. at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=42068&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=f>
10. Beck, J. M. & Cushion, M. T. Pneumocystis workshop: 10th anniversary summary. *Eukaryot. Cell* **8**, 446–60 (2009).
11. Rivero, L. *et al.* Pneumocystis jirovecii transmission from immunocompetent carriers to infant. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 1116–1118 (2008).
12. Calderón, E. J., Gutiérrez-Rivero, S., Durand-Joly, I. & Dei-Cas, E. Pneumocystis infection in humans: Diagnosis and treatment. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **8**, 683–701 (2010).
13. Djawe, K. *et al.* Serum antibody levels to the *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein in the diagnosis of *P. jirovecii* pneumonia in HIV+ patients. *PLoS One* **5**, 1–8 (2010).
14. Palella, F. J. *et al.* Serologic responses to *Pneumocystis* Proteins in Human Immunodeficiency Virus Patients With and Without *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *J Acquir Immune Defic Syndr* **57**, 190–196 (2011).
15. Blount, R. J. *et al.* Serologic responses to recombinant *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein among Ugandan patients with respiratory symptoms. *PLoS One* **7**, 1–9 (2012).

16. Tomás, A. Novas abordagens no diagnóstico serológico da pneumocistose. (IHMT-UNL, 2014).
17. Esteves, F. *et al.* Diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*: Evaluation of four serologic biomarkers. *Clin. Microbiol. Infect.* **21**, 379.e1–379.e10 (2015).
18. Tasaka, S. *et al.* Serum indicators for the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*. *Chest* **131**, 1173–1180 (2007).
19. Esteves, F. *et al.* (1-3)-Beta-D-glucan in association with lactate dehydrogenase as biomarkers of *Pneumocystis pneumonia* (PcP) in HIV-infected patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **33**, 1173–1180 (2014).
20. Larguinho, M. & Baptista, P. V. Gold and silver nanoparticles for clinical diagnostics - From genomics to proteomics. *J. Proteomics* **75**, 2811–23 (2012).
21. Alzoubi, F. Y., Alzouby, J. Y., Alqadi, M. K., Alshboul, H. A. & Aljarrah, K. M. Synthesis and characterization of colloidal gold nanoparticles controlled by the pH and ionic strength. *Chinese J. Phys.* **53**, 1–10 (2015).
22. Das, M., Shim, K. H., An, S. S. a & Yi, D. K. Review on gold nanoparticles and their applications. *Toxicol. Environ. Health Sci.* **3**, 193–205 (2011).
23. Zeng, S. *et al.* A review on functionalized gold nanoparticles for biosensing applications. *Plasmonics* **6**, 491–506 (2011).
24. Huang, X. & El-Sayed, M. A. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *J. Adv. Res.* **1**, 13–28 (2010).
25. Cobley, C. M., Chen, J., Cho, E. C., Wang, L. V & Xia, Y. Gold nanostructures: A class of multifunctional materials for biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 44–56 (2011).
26. Viswambari Devi, R., Doble, M. & Verma, R. S. Nanomaterials for early detection of cancer biomarker with special emphasis on gold nanoparticles in immunoassays/sensors. *Biosens. Bioelectron.* **68**, 688–698 (2015).
27. Gold nanoparticles. at  
<[http://education.mrsec.wisc.edu/SlideShow/slides/nanoparticles/gold\\_salt.html](http://education.mrsec.wisc.edu/SlideShow/slides/nanoparticles/gold_salt.html)>
28. Pfeiffer, C. *et al.* Interaction of colloidal nanoparticles with their local environment: the (ionic) nanoenvironment around nanoparticles is different from bulk and determines the physico-chemical properties of the nanoparticles. *J. R. Soc. Interface* **11**, 20130931 (2014).
29. Sperling, R. a & Parak, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Phil. Trans R. Soc. A* **368**, 1333–1383 (2010).
30. Baptista, P. *et al.* Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 943–50 (2008).
31. Turkevich, J., Stevenson, P. C. & Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* **11**, 55–75 (1951).

32. Kimling, J. *et al.* Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J. Phys. Chem. B* **110**, 15700–15707 (2006).
33. Verma, H. N., Singh, P. & Chavan, R. M. Gold nanoparticle: Synthesis and characterization. *Vet. World* **7**, 72–77 (2014).
34. Lim, J., Lee, N., Lee, E. & Yoon, S. Surface modification of citrate-capped gold nanoparticles using CTAB micelles. *Bull. Korean Chem. Soc.* **35**, 2567–2569 (2014).
35. Baptista, P. V. *et al.* in *Progress in molecular biology and translational science* (ed. Villaverde, A.) **104**, 429–436 (Academic Press, 2011).
36. Gomes, I. *et al.* Controlled adsorption of cytochrome c to nanostructured gold surfaces. *J. Nanoparticle Res.* **14**, 1–12 (2012).
37. Bolat, G., Kuralay, F., Eroglu, G. & Abaci, S. Fabrication of a polyaniline ultramicroelectrode via a self assembled monolayer modified gold electrode. *Sensors (Basel)*. **13**, 8079–8094 (2013).
38. Lévy, R. *et al.* Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 10076–10084 (2004).
39. Lévy, R. Peptide-capped gold nanoparticles: Towards artificial proteins. *ChemBioChem* **7**, 1141–1145 (2006).
40. Cortez, J. *et al.* Bionanoconjugates of tyrosinase and peptide-derivatised gold nanoparticles for biosensing of phenolic compounds. *J. Nanoparticle Res.* **13**, 1101–1113 (2011).
41. You, C. C., De, M. & Rotello, V. M. Monolayer-protected nanoparticle-protein interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**, 639–646 (2005).
42. Boulos, S. P. *et al.* Nanoparticle-protein interactions: A thermodynamic and kinetic study of the adsorption of bovine serum albumin to gold nanoparticle surfaces. *Langmuir* **29**, 14984–96 (2013).
43. Karakus, C. & Salih, B. a. Comparison of the lateral flow immunoassays (LFIA) for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J. Immunol. Methods* **396**, 8–14 (2013).
44. Sajid, M., Kawde, A.-N. & Daud, M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *J. Saudi Chem. Soc.* (2014). doi:10.1016/j.jscs.2014.09.001
45. Liang, A., Liu, Q., Wen, G. & Jiang, Z. The surface-plasmon-resonance effect of nanogold/silver and its analytical applications. *TrAC Trends Anal. Chem.* **37**, 32–47 (2012).
46. Valcárdel, M. & López-Lorente, Á. *Gold nanoparticles in analytical chemistry*. 529–534; 569–605 (Elsevier, 2014).
47. Quesada-González, D. & Merkoçi, A. Nanoparticle-based lateral flow biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **73**, 47–63 (2015).
48. Farrell, B. O. in *The Immunoassay Handbook* (ed. Wild, D.) 89–107 (Elsevier Ltd, 2013). doi:10.1016/B978-0-08-097037-0.00078-6

49. Lateral flow tests. at <<http://sites.path.org/dx/rapid-dx/technologies/lateral-flow/>>
50. Koivunen, M. E. & Krogsrud, R. L. Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories. *Lab. Med.* **37**, 490–497 (2006).
51. Gan, S. D. & Patel, K. R. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Invest. Dermatol.* **133**, e12 (2013).
52. Wilson, K. & Walker, J. *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. 285–287; 321–322; 399–410; 459–461 (Cambridge University Press, 2010).
53. Overview of ELISA. at <<https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>>
54. Xu, X. *et al.* Size and shape separation of gold nanoparticles with preparative gel electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **1167**, 35–41 (2007).
55. Zheng, Y. *et al.* Separation of different shape biosynthesized gold nanoparticles via agarose gel electrophoresis. *Sep. Purif. Technol.* **151**, 332–337 (2015).
56. Zanchet, D. *et al.* Electrophoretic and structural studies of DNA-directed Au nanoparticle groupings. *J. Phys. Chem. B* **106**, 11758–11763 (2002).
57. Cavadas, M. Gold nanoparticle to antibody conjugates for diagnosis applications: Molecular interactions and immunoassay development. (FCT-UNL, 2011).
58. Bergkessel, M. & Guthrie, C. in *Laboratory Methods in Enzymology: DNA* (ed. Enzymology, J. L. B. T.-M. in) **529**, 299–309 (Academic Press, 2013).
59. E. coli growth and induction with IPTG. at <<http://sbio.uct.ac.za/documents/e-coli-growth-and-induction-with-iptg/>>
60. Sezonov, G., Joseleau-Petit, D. & D'Ari, R. Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth. *J. Bacteriol.* **189**, 8746–8749 (2007).
61. E. coli protein extraction kit. at <[http://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCsQFjAAahUK Ewi\\_0KXPIJXGAhVLuhQKHTrFC9E&url=http://www.openbiotech.com/v/vspfiles/assets/images/e coli protein extraction kit for 2 liters.pdf&e](http://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCsQFjAAahUK Ewi_0KXPIJXGAhVLuhQKHTrFC9E&url=http://www.openbiotech.com/v/vspfiles/assets/images/e%20coli%20protein%20extraction%20kit%20for%202%20liters.pdf&e)>
62. Boesenberg-Smith, K. A., Pessarakli, M. M. & Wolk, D. M. Assessment of DNA yield and purity: An overlooked detail of PCR troubleshooting. *Clin. Microbiol. Newsl.* **34**, 1–6 (2012).
63. E. coli calcium chloride competent cell protocol. at <[http://www.med.nyu.edu/medicine/labs/blaserlab/Protocols/E-coli\\_competent\\_cells\\_protocol\\_&\\_transformation.pdf](http://www.med.nyu.edu/medicine/labs/blaserlab/Protocols/E-coli_competent_cells_protocol_&_transformation.pdf)>
64. Grimm, R. *et al.* A rapid method for analyzing recombinant protein inclusion bodies by mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **330**, 140–4 (2004).

65. Pina, A. S., Lowe, C. R. & Roque, A. C. A. Challenges and opportunities in the purification of recombinant tagged proteins. *Biotechnol. Adv.* **32**, 366–81 (2014).
66. Gaberc-Porekar, V. & Menart, V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *J. Biochem. Biophys. Methods* **49**, 335–360 (2001).
67. Baptista, P., Doria, G., Henriques, D., Pereira, E. & Franco, R. Colorimetric detection of eukaryotic gene expression with DNA-derivatized gold nanoparticles. *J. Biotechnol.* **119**, 111–7 (2005).
68. Zhao, P., Li, N. & Astruc, D. State of the art in gold nanoparticle synthesis. *Coord. Chem. Rev.* **257**, 638–665 (2013).
69. Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J. & Fernig, D. G. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. *Anal. Chem.* **79**, 4215–4221 (2007).
70. Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J. & Fernig, D. G. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV - Vis Spectra. 4215–4221 (2007). doi:10.1021/ac0702084
71. ELISA procedure. at <<http://www.rockland-inc.com/elisa.aspx>>
72. Bicinchoninic acid kit for protein determination. at <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/bca1?lang=pt&region=PT>>
73. Carrió, M. M. & Villaverde, A. Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. *FEBS Lett.* **489**, 29–33 (2001).
74. Carrió, M. . & Villaverde, A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J. Biotechnol.* **96**, 3–12 (2002).
75. Peternel, S. & Komel, R. Isolation of biologically active nanomaterial (inclusion bodies) from bacterial cells. *Microb. Cell Fact.* **9**, 1–16 (2010).
76. Traditional methods of cell lysis. at <<https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/traditional-methods-cell-lysis.html>>
77. Jia, X., Kostal, J. & Claypool, J. A. Controlled lysis of bacteria. (2011). at <[http://www.google.de/patents?id=F\\_4oAQAAEBAJ&printsec=frontcover&dq=7892811b2&hl=en&ei=hIOeTvYuO8fSsgaVnPWDCQ&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=1&ved=0CC4Q6AEwAA](http://www.google.de/patents?id=F_4oAQAAEBAJ&printsec=frontcover&dq=7892811b2&hl=en&ei=hIOeTvYuO8fSsgaVnPWDCQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CC4Q6AEwAA)>
78. Panja, S., Saha, S., Jana, B. & Basu, T. Role of membrane potential on artificial transformation of E. coli with plasmid DNA. *J. Biotechnol.* **127**, 14–20 (2006).
79. Zhu, S., Gong, C., Ren, L. & Li, X. A simple and effective strategy for solving the problem of inclusion bodies in recombinant protein technology: His-tag deletions enhance soluble expression. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 837–45 (2013).
80. Chi, R., Cheung, F., Wong, J. H. & Ng, T. B. Immobilized metal ion affinity chromatography: A review on its applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **96**, 1411–1420 (2012).

81. Baird, J. A., Olayo-Valles, R., Rinaldi, C. & Taylor, L. Effect of molecular weight, temperature, and additives on the moisture sorption properties of polyethylene glycol. *J. Pharm. Sci.* **99**, 154–168 (2010).
82. Santos, M. J., Teixeira, J. a. & Rodrigues, L. R. Fractionation and recovery of whey proteins by hydrophobic interaction chromatography. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **879**, 475–479 (2011).
83. Ines, G., Santos, N. C., Quintas, A., Eaton, P. & Franco, R. Probing surface properties of cytochrome. *Adsorpt. J. Int. Adsorpt. Soc.* **112**, 16340–16347 (2008).
84. Guirgis, B. S. S. *et al.* Gold nanoparticle-based fluorescence immunoassay for malaria antigen detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **402**, 1019–1027 (2012).
85. Couto, C. Active bionanoconjugates of laccase and gold nanoparticles: Kinetic and structural studies. (FCT-UNL, 2012).
86. Fujiwara, K., Watarai, H., Itoh, H., Nakahama, E. & Ogawa, N. Measurement of antibody binding to protein immobilized on gold nanoparticles by localized surface plasmon spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 639–644 (2006).
87. Hanauer, M., Pierrat, S., Zins, I., Lotz, A. & Sönnichsen, C. Separation of nanoparticles by gel electrophoresis according to size and shape. *Nano Lett.* **7**, 2881–2885 (2007).
88. Amoroso, M. Nanoimunoensaios para a detecção de antígenos da malária em amostras clínicas. (FCT-UNL, 2014).
89. Sakura, T., Takahashi, T., Kataoka, K. & Nagasaki, Y. One-pot preparation of mono-dispersed and physiologically stabilized gold colloid. *Colloid Polym. Sci.* **284**, 97–101 (2005).
90. Sodium citrate tribasic dihydrate. at <[https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/c0909pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/c0909pis.pdf)>
91. aLICator LIC Cloning & Expression System. at <<https://www.thermofisher.com/pt/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-molecular-biology-products/alicator-cloning-system.html>>
92. McAlister, M., Phelan, J. & Sarra, R. Purification/Polishing of His-tagged proteins - Application of centrifugal vivapure ion-exchange membrane devices to the purification/polishing of His-tagged proteins for crystallization. *VIVASCIENCE* 1–8 at <[http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Tag\\_Protein\\_Purification/Ni-NTA/VivapureChelate\\_MiniSpinII.pdf](http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Tag_Protein_Purification/Ni-NTA/VivapureChelate_MiniSpinII.pdf)>
93. Biradar, A. A. *et al.* Bicinchoninic acid-based colorimetric chemosensor for detection of low concentrations of cyanide. *Sensors Actuators B Chem.* **222**, 112–119 (2016).
94. Bainor, A., Chang, L., McQuade, T. J., Webb, B. & Gestwicki, J. E. Bicinchoninic acid (BCA) assay in low volume. *Anal. Biochem.* **410**, 310–312 (2011).



95. Electrophoresis. at  
<<http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/CategoryDisplay?categoryId=1205820&catalogId=10102&productId=&top=Y&storeId=11776&langId=-1>>

**Página em Branco**

# ANEXOS

## Anexo 1 - Vetor de expressão pLATE31

A **Figura A.1** apresenta os elementos genéticos que constituem o vetor de expressão pLATE31. As funções desses elementos encontram-se descritas no **Quadro A.1**.

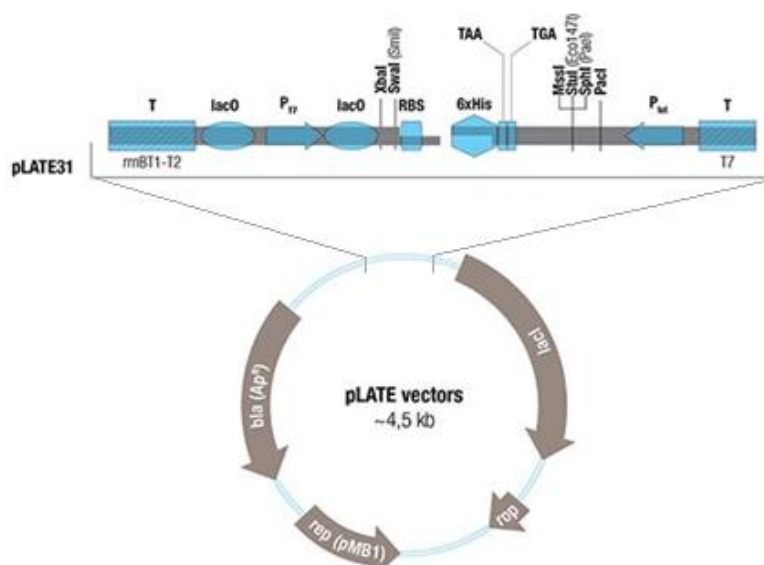


Figura A.1 Elementos do vetor pLATE31. Adaptado de<sup>91</sup>

Quadro A.1 Funções dos elementos que constituem o vetor pLATE31. Adaptado de<sup>91</sup>.

Elemento	Função
<b>6xHis</b>	Cauda C-terminal de poli-histidinas;
<b>bla (Ap<sup>r</sup>)</b>	Gene β-lactamase que confere resistência à ampicilina;
<b>lacO</b>	Operão lac que controla a expressão do gene;
<b>lacI</b>	Repressor lac que controla a expressão basal a partir do promotor T7;
<b>P<sub>T7</sub></b>	Promotor de T7 RNA polimerase que controla a transcrição do gene clonado;
<b>P<sub>tet</sub></b>	Promotor P <sub>tet</sub> que reduz a expressão basal a partir do promotor T7;
<b>RBS</b>	Local de ligação do ribossoma para a tradução do gene clonado;
<b>rep (pMB1)</b>	Origem de replicação (rep) do plasmídeo pMB1;
<b>rop</b>	Proteína rop que regula o número de cópias do plasmídeo;
<b>T rrnBT1-T2</b>	Terminador da transcrição rrnBT1-T2 que evita a expressão basal do gene;
<b>T T7</b>	Terminador T7 que termina a transcrição a partir do promotor T7.

Quadro A.2 Sequência dos primers utilizados que permitem obter o amplicão correspondente à sequência do antígeno inserido no vetor de expressão pLATE31<sup>16</sup>.

<b>Primer pLATE31Fw</b>	5'AGAAGGAGATATAACTATGGGCACCACCGAAATCCTGA 3'
<b>Primer pLATE31Rv</b>	5'GTGGTGGTGATGGTGATGGCCGCCACGCATCACGGACCA 3'
<b>Tamanho do amplicão</b>	478 pb

## Anexo 2 - Isolamento de DNA plasmídico pelo kit illustra plasmidPrep Mini Spin Kit

Como o procedimento para isolar o DNA plasmídico não foi idêntico para as duas colónias escolhidas aleatoriamente, estas foram denominadas como colónia A e colónia B para melhor compreensão das etapas aplicadas.

### **1. Recolha da cultura celular**

Primeiramente, inoculou-se cada colónia em 5 mL de meio LB com ampicilina a 100 µg/mL, que incubou *O.N.*, 37°C com agitação de 140 rpm. Findo este período, transferiu-se 1,5 mL de cada cultura para os respetivos *ependorfs* de 1,5 mL e centrifugou-se à temperatura ambiente, 30 s a 16000 x g (*Tabletop Micro Centrifuge Model 3300*, rotor RA-2724).

### **2. Lise celular**

Descartaram-se os sobrenadantes e cada sedimento foi ressuspenso em 200 µL de tampão de lise tipo 7. Homogeneizaram-se as soluções por ação do *vortex* e adicionou-se 200 µL de tampão de lise tipo 8 a cada *ependorf*. Inverteram-se os tubos cuidadosamente, aproximadamente 10 vezes, não excedendo um período máximo de 5 min, até se obter uma solução viscosa. De seguida, adicionou-se 450 µL de tampão de lise tipo 9 a cada *ependorf* e homogeneizou-se cuidadosamente por inversão dos mesmos, aproximadamente 20 vezes. Procedeu-se à centrifugação durante 5 min a 16000 x g.

### **3. Ligação do plasmídeo à coluna de purificação**

Cada sobrenadante foi transferido para uma coluna de purificação e centrifugou-se durante 30 s a 16000 x g. Em seguida descartaram-se os fluídos presentes nos tubos de recolha.

### **4. Lavagem da coluna de purificação**

A coluna foi lavada com 400 µL de tampão de lise tipo 9 e centrifugou-se durante 30 s a 16000 x g. De acordo com o fabricante do *kit* este passo é opcional dependente da estirpe com que se está a trabalhar, por esta razão optou-se por não executar esta etapa para a colónia B, com o intuito de verificar se existem diferenças no isolamento do DNA plasmídico.

### **5. Lavagem e secagem da coluna de purificação**

O fluído resultante no tubo de recolha da colónia A foi novamente descartado e adicionou-se a ambas as colunas 400 µL tampão de lavagem tipo 1. Centrifugou-se duas vezes durante 30 s a 16000 x g. Descartaram-se os tubos de recolha juntamente com os fluídos resultantes da centrifugação.

### **6. Eluição do DNA plasmídico da coluna de purificação**

Cada coluna foi colocada num *ependorf* de 1,5 mL e adicionou-se 50 µL de tampão de eluição tipo 4. Deixou-se incubar durante 1 min a 60°C e centrifugou-se por 30 s a 16000 x g. Descartaram-se as colunas e os *ependorfs* com o DNA plasmídico A e DNA plasmídico B foram guardados a -20 °C.

## Anexo 3 - Ensaios realizados para otimizar a purificação do antígeno

### *1º Ensaio - Purificação por IMAC seguido de PEG 8000*

Para o primeiro ensaio purificaram-se cinco amostras. A coluna de cromatografia com uma resina de níquel (sulfato de níquel hexa-hidrato a 0,1 M; *Merck*) foi primeiramente equilibrada com 10 mL de tampão de lavagem (NaCl 500 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM; imidazole 20 mM; pH 7,4). Aplicou-se a amostra lentamente para garantir que o antígeno se ligava à resina. O volume eluído foi coletado e aplicado novamente na coluna de cromatografia. Em seguida a coluna foi lavada com 10 mL de tampão de lavagem, para remover proteínas ligadas não especificamente à resina. O antígeno foi eluído da coluna com 10 mL de tampão de eluição (NaCl 500 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM; imidazole 500 mM; pH 7,4). Por fim, a coluna foi novamente equilibrada com 5 mL de tampão de lavagem. O volume eluído durante a purificação foi recolhido em frações de 1 mL e armazenado a 4°C.

Para cada ensaio descrito no presente estudo e entre cada purificação, foi necessário remover os íons metálicos com uma solução de NaCl a 500 mM, EDTA a 50 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, pH 7,4. A coluna foi também lavada com NaOH (*Merck*) a 1 M para remover possíveis proteínas que tenham precipitado no seu interior. Por último, a coluna foi carregada com a solução de íon níquel, lavada e equilibrada com tampão de lavagem. Após este procedimento a coluna está apta para purificar outra amostra. No total purificaram-se cinco amostras.

Por ELISA foi possível confirmar a presença do antígeno nas frações eluídas com tampão de eluição. Para concentrar o antígeno, verteram-se essas frações para uma fita de diálise (volume final de 50 mL), esta foi fechada, colocada sobre uma folha de papel de alumínio e posteriormente coberta com PEG 8000 (*AppliChem*), guardou-se a 4°C. Em seguida, dialisou-se a amostra contra tampão fosfato de sódio a 20 mM pH 7,0, *O.N.* a 4°C.

No dia seguinte, recolheu-se o volume do interior da fita de diálise para um *falcon* e centrifugou-se à temperatura ambiente, durante 20 min a 5002 x g. Guardou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspensionado em 1 mL de tampão fosfato de sódio a 20 mM pH 7,0. A pureza da proteína em estudo foi avaliada por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15%.

### *2º Ensaio - Purificação por IMAC com gradiente descontínuo de imidazole, seguido de PEG 8000*

Neste ensaio experimentou-se purificar o antígeno com recurso a um gradiente descontínuo de soluções de imidazole a 20, 100, 200 e 500 mM. Para este gradiente e nas quatro soluções

utilizadas manteve-se igual a concentração de NaCl (500 mM), de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (20 mM) e o valor de pH 7,4, o que variou foi somente a concentração de imidazole. Desta forma, a coluna de cromatografia com resina de Ni<sup>2+</sup> foi previamente equilibrada com 10 mL de solução de imidazole a 20 mM. Aplicou-se a amostra duas vezes e a coluna foi lavada com um gradiente discreto de soluções de imidazole a 20, 100, 200 e 500 mM, com 10 mL de cada solução. Por fim, foi novamente lavada com 5 mL de solução de imidazole a 20 mM.

Por ELISA foi possível confirmar a presença do antígeno e avaliar o resultado do gradiente de imidazole aplicado. Para uma fita de diálise, juntaram-se as frações eluídas com a solução contendo imidazole a 100 mM e concentrou-se com PEG 8000, a 4°C. Repetiu-se este passo para os volumes eluídos com imidazole a 200 e 500 mM. Posteriormente, cada amostra foi dialisada contra tampão NaCl 500 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, pH 7,6 *O.N.* a 4°C. No dia seguinte, cada amostra foi transferida para um *falcon* e centrifugou-se à temperatura ambiente, durante 20 min a 5002 x g. Guardaram-se os sobrenadantes e cada sedimento foi ressuspensionado em 500 µL de tampão NaCl 500 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, pH 7,6. Por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15% foi possível avaliar a pureza do antígeno, bem como o efeito do gradiente de imidazole na purificação.

### *3º Ensaio - Choque térmico seguido de purificação por IMAC e PEG 800*

Antes de se proceder à purificação, uma amostra foi sujeita a um choque térmico a 100°C. Isto é, o tubo que continha a amostra foi submerso num copo com água em ebulição, durante 10 min. Depois de a amostra arrefecer à temperatura ambiente, foi purificada utilizando uma resina de níquel por um gradiente descontínuo de soluções de imidazole a 20, 100 e 500 mM, utilizando 10 volumes de cada solução. As concentrações de NaCl (500 mM), de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (20 mM) e o valor de pH (7,4) mantiveram-se iguais, apenas variou a concentração de imidazole em cada solução.

Por ELISA verificou-se a presença do antígeno nas frações eluídas pela solução de imidazole a 500 mM. Assim, o volume eluído a esta concentração de imidazole foi concentrado numa fita de diálise com PEG 8000 a 4°C, até se atingir um volume menor. Posteriormente, dialisou-se a amostra contra tampão NaCl 500 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, pH 7,6 *O.N.* a 4°C. Após este período, transferiu-se o volume da fita de diálise para um tubo e centrifugou-se à temperatura ambiente, durante 20 min a 5002 x g. Guardou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspensionado em 500 µL de tampão de diálise. Por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15% foi possível determinar o resultado do choque térmico e avaliar a pureza do antígeno.

#### *4º Ensaio - Purificação por IMAC seguido de PEG 8000 e ultraconcentração Amicon*

No total purificaram-se seis amostras recorrendo uma resina de íão níquel utilizando 10 mL de tampão de lavagem e de eluição, como indicado no **1º Ensaio**. Após a purificação, por ELISA verificou-se a presença do antígeno nas frações eluídas pelo tampão de eluição. Consequentemente, o volume correspondente a estas frações foi concentrado numa fita de diálise com PEG 8000, a 4°C, até se observar um volume menor. Concentrou-se novamente a amostra num sistema de ultraconcentração *Amicon* de 15 mL, com uma membrana de 30 kDa (*Merck Millipore*), seguido por três ciclos de centrifugação à temperatura ambiente, durante 20 min a 5000 x g. No final, o volume retido pela membrana do *Amicon* foi avaliado por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15%.

#### *5º Ensaio - Purificação por IMAC seguido de ultraconcentração Amicon*

Oito amostras foram purificadas utilizando uma resina de níquel, com 10 volumes de tampão de lavagem e de eluição, conforme exposto no **1º Ensaio**. Em seguida, por ELISA foi possível inferir a presença do antígeno nas frações eluídas com tampão de eluição. Essas frações, que correspondiam a um volume final de 80 mL, foram concentradas num *Amicon*. Centrifugou-se à temperatura ambiente, durante 15 min a 5000 x g. Repetiu-se este ciclo até se obter um menor volume de antígeno. No total usaram-se 2 sistemas de ultraconcentração *Amicon* para concentrar o antígeno. O volume resultante da concentração no sistema *Amicon* foi novamente concentrado numa fita de diálise com PEG 8000, a 4°C. Seguidamente dialisou-se a amostra contra tampão NaCl 125 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, pH 8,5, *O.N.* a 4°C. Finalmente, por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15% foi possível para avaliar o resultado da metodologia aplicada.

#### *6º Ensaio - Purificação por IMAC com quatro íões metálicos diferentes*

Além do níquel, outros íões divalentes como cobre (Cu<sup>2+</sup>), zinco (Zn<sup>2+</sup>) e cobalto (Co<sup>2+</sup>) podem ser utilizados para purificar proteínas recombinantes com cauda de His<sup>65</sup>. Em virtude do exposto, purificaram-se quatro amostras utilizando os metais acima mencionados. A ordem de purificação foi a seguinte:

1. Coluna de cromatografia com resina de cobre (sulfato de cobre penta-hidratado (*Merck*) a 0,1M);
2. Coluna de cromatografia com resina de zinco (sulfato de zinco hepta-hidratado (*Merck*) a 0,1 M);



3. Coluna de cromatografia com resina cobalto (cloreto de cobalto hexa-hidratado (Merck) a 0,1 M);
4. Coluna de cromatografia com resina de níquel (sulfato de níquel hexa-hidrato (Merck) a 0,1 M).

Genericamente, depois de equilibrar a coluna de cromatografia com 10 mL de tampão de lavagem, aplicou-se a amostra duas vezes. Em seguida, lavou-se novamente a coluna com 10 mL de tampão de lavagem, seguidos de 10 mL de tampão de eluição.

Por ELISA foi possível confirmar a presença do antígeno nas frações relativas ao tampão de eluição, para as purificações referentes aos quatro íons metálicos.

Assim, o volume eluído com tampão de eluição para a cromatografia com resina de íon cobre, foi concentrado numa fita de diálise com PEG 8000, a 4°C. Repetiu-se este passo para as restantes cromatografias. Em seguida, dialisou-se cada volume contra tampão NaCl 125 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, pH 8,5, *O.N.* a 4°C. Por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15% foi possível avaliar o resultado das purificações com os diferentes íons metálicos.

#### *7º Ensaio - Purificação por IMAC de íon cobre com gradiente descontínuo de imidazole*

Uma vez que se obtiveram melhores resultados com a resina de íon cobre, experimentou-se purificar o antígeno utilizando este metal com um gradiente descontínuo de soluções de imidazole a 20, 100, 200 e 500 mM. As concentrações de NaCl (500 mM), de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (20 mM) e o valor de pH (7,4) mantiveram-se iguais, apenas variou a concentração de imidazole em cada solução.

A coluna de cromatografia, com uma resina de íon cobre, foi previamente equilibrada com 10 mL de solução de imidazole a 20 mM. Aplicou-se duas vezes a amostra e a coluna foi lavada com um gradiente descontínuo de imidazole a 20, 100, 200 e 500 mM, com 10 mL de cada solução. Por último, a coluna foi novamente equilibrada com 3 mL de solução de imidazole a 20 mM.

Para confirmar a presença do antígeno realizou-se um ensaio de ELISA a todas as frações eluídas da coluna. O volume eluído com imidazole a 100 mM foi dialisado contra tampão NaCl 125 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, pH 8,5, *O.N.* a 4°C. Procedeu-se à diálise para os volumes eluídos com imidazole a 200 e 500 mM. Com o intuito de avaliar o resultado do gradiente de imidazole e a pureza do antígeno realizou-se um gel SDS-PAGE a 15%.

### *8º Ensaio - Purificação por IMAC de ião cobre e posteriormente por cromatografia de troca iónica*

Neste ensaio, uma amostra foi purificada utilizando uma resina de ião cobre com 10 mL de tampão de lavagem e 10 mL de tampão de eluição. Por ELISA verificou-se que o antígeno foi eluído da coluna com tampão de eluição.

Juntaram-se as duas primeiras frações eluídas com o tampão de eluição e purificou-se 1 mL por cromatografia de troca iónica com uma resina aniónica, adaptado de<sup>92</sup>. Para tal, uma coluna de cromatografia *SP Sepharose Fast Flow (GE Healthcare)* de 1 mL foi empacotada com 1 mL de resina *Q Sepharose Fast Flow (GE Healthcare)*. A coluna foi previamente equilibrada com 10 mL de tampão de lavagem (imidazole 20 mM; pH 9,0). A amostra foi diluída 1:10 em água destilada e aplicada lentamente na coluna. Recolheu-se o volume eluído e aplicou-se novamente. Em seguida, a coluna foi lavada com 10 mL de tampão de lavagem e posteriormente com 10 mL de tampão de eluição (imidazole 20 mM; NaCl 1M; pH 9,0). Por último, para remover possíveis proteínas que tenham ficado agarradas à resina esta foi lavada com 5 mL de NaCl a 2M. O volume eluído no decorrer da purificação foi coletado em frações de 1 mL.

Por ELISA foi possível avaliar o resultado da cromatografia de troca iónica. O volume eluído após a aplicação da amostra foi concentrado numa fita de diálise com PEG 8000, a 4°C. Os volumes eluídos com tampão de lavagem, tampão de eluição e com NaCl a 2 M também foram concentrados em fitas de diálise com PEG 8000, a 4°C. De forma a avaliar a pureza do antígeno e o resultado das duas cromatografias aplicadas, procedeu-se à eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15%.

### *9º Ensaio - Antígeno purificado por IMAC para posteriormente se conjugar com AuNP*

Para a conjugação com as AuNP, purificaram-se sete amostras utilizando uma resina de ião  $\text{Cu}^{2+}$ . Resumidamente, depois de equilibrar a coluna de cromatografia com 10 mL de tampão de lavagem (NaCl 500 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM; imidazole 20 mM; pH 7,4) aplicou-se a amostra duas vezes. Em seguida, lavou-se novamente a coluna com 10 mL de tampão de lavagem seguidos de 10 mL de tampão de eluição (NaCl 500 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM; imidazole 500 mM; pH 7,4). Por fim, a coluna foi novamente equilibrada com 5 mL de tampão de lavagem.

Para cada purificação juntaram-se num *falcon* as frações que apresentavam maior valor de absorvância por ELISA, indicativo de maior concentração de antígeno. Enquanto as frações que continham antígeno mas que apresentavam menor valor de absorvância foram guardadas noutro *falcon*. No final, todos os *falcons* foram guardados a 4°C.

Para determinar a concentração de antígeno recorreu-se ao método do BCA e por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15% foi possível avaliar a sua pureza.

## Anexo 4 - Eletroforese em gel de SDS-PAGE

A eletroforese em gel de SDS-PAGE é uma técnica aplicada recorrentemente para analisar qualitativamente misturas de proteínas. Esta técnica fundamenta-se na separação das proteínas de acordo com o seu tamanho, mas também pode ser utilizada para determinar a massa molecular relativa das proteínas. O gel de poliacrilamida é formado pela polimerização de monómeros de acrilamida na presença de uma pequena quantidade de bisacrilamida. Este processo de polimerização é iniciado pela adição de persulfato de amónia e estabilizado pelo tetra-metil-etilenodiamina (TEMED). Antes de carregar as amostras no gel, estas são fervidas por um período de tempo em tampão de amostra que contem  $\beta$ -mercaptoetanol (reduz as pontes de dissulfureto que conferem a estrutura terciária às proteínas) e SDS (dodecilssulfato de sódio, tensoativo aniónico que se liga fortemente às proteínas, desnaturando-as). Após este tratamento, as proteínas apresentam estrutura linear e carga negativa. O tampão de amostra contém ainda um corante, normalmente azul de bromofenol, que permite monitorizar a corrida eletroforética<sup>52</sup>.

Na presença de uma corrente elétrica, as proteínas como apresentam carga negativa migram em direção ao eletrodo positivo. O gel é dividido em duas partes: gel de concentração e de separação. As amostras são carregadas no gel de concentração que permite que as proteínas entrem ao mesmo nível no gel de separação, para posteriormente comparar as distâncias migradas. As proteínas são separadas de acordo com o seu tamanho no gel de separação. Desta forma, quanto menor o tamanho da proteína, maior é a facilidade em atravessar os poros do gel, sendo que o tamanho dos poros pode ser variado pela variação da concentração da acrilamida e da bisacrilamida<sup>52</sup>. A **Figura A.2** ilustra o aparelho utilizado na técnica de SDS-PAGE.

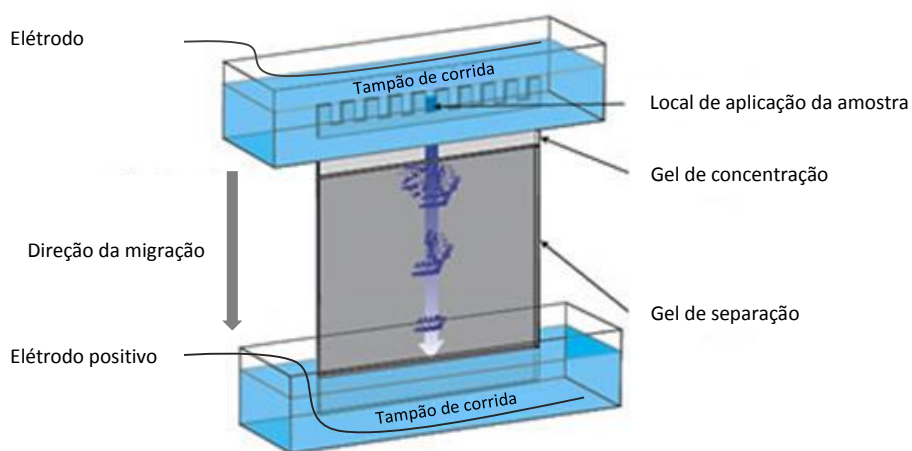


Figura A.2 Representação do aparelho utilizado na técnica de SDS-PAGE. Adaptado de<sup>95</sup>

O gel de separação foi preparado com acrilamida a 15% e o gel de concentração com acrilamida a 6%. A composição de cada gel encontra-se detalhada no **Quadro A.3**.

*Quadro A.3 Composição das soluções para o gel de SDS-PAGE 15%.*

	Gel de separação (Acrilamida a 15%)	Gel de concentração (Acrilamida a 6%)
Reagentes	Volume (mL)	Volume (mL)
Água destilada	2,8	2,9
Acrilamida 40% (Nzytech)	3	0,75
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2	-
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	-	1,25
SDS 10% (p/v) (Merck)	0,08	0,05
Persulfato Amónia 10% (PA; Sigma-Aldrich)	0,08	0,05
TEMED (Sigma-Aldrich)	0,008	0,005

## Anexo 5 - Método do Ácido Bicinconínico

O método do ácido bicinconínico é frequentemente utilizado para estimar a concentração de proteínas. Na presença de proteínas e em combinação com os íons cobre(II), o ácido bincinconínico (BCA) desencadeia uma mudança de cor de verde para roxo. Esta mudança de cor resulta da redução de cobre(II) a cobre(I) pelas ligações peptídicas presentes nas proteínas, e a formação concomitantemente dos complexos Cu(I)-BCA que absorvem fortemente a 562 nm. Este método permite detetar até 0,5 µg/mL de proteína, o que o torna bastante sensível comparativamente a outros métodos de quantificação de proteínas<sup>93,94</sup>.

Após se incubar as amostras durante 30 min a 37°C, é necessário construir retas de calibração com a proteína BSA para se determinar a concentração da proteína de interesse, tal como explicado no ponto 2.10.4. A **Figura A.3** corresponde à reta de calibração para o cálculo da concentração de antígeno para as amostras de A a F. A reta de calibração apresentada na **Figura A.4** corresponde à amostra G.

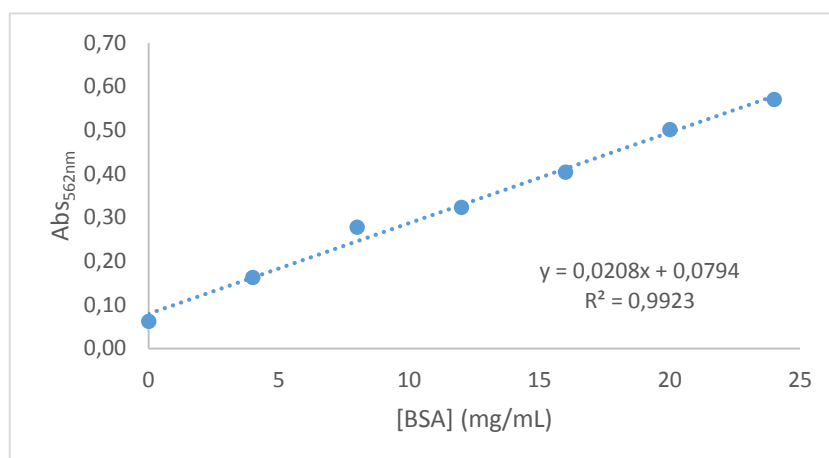


Figura A.3 Reta de calibração para determinar a concentração de antígeno nas amostras de A a F.

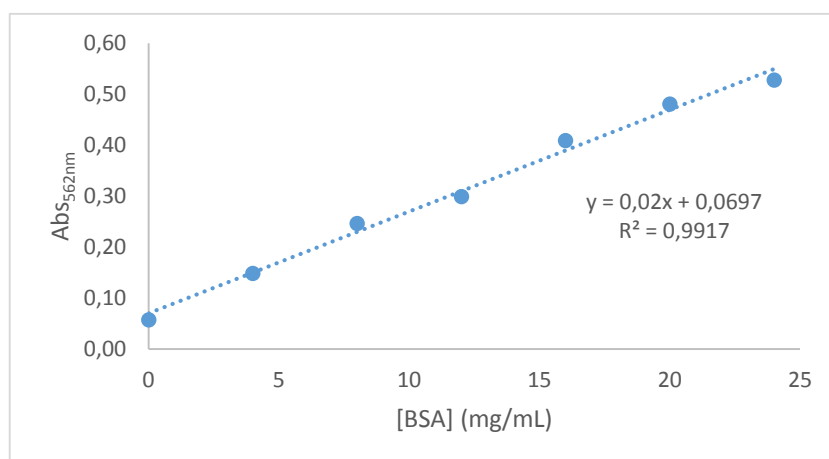


Figura A.4 Reta de calibração para determinar a concentração de antígeno na amostra G.

Através das equações das retas de calibração é possível determinar a concentração de antigénio para as amostras numeradas de A a G, tal como se apresenta no **Quadro A.4**.

Quadro A.4 Concentração de antigénio pelo método de BCA para as amostras numeradas de A a G.

<i>Falcon</i>	Volume (μL)	Concentração (mg/mL)	Concentração para 10 μL (mg/mL)
<b>Amostra A: frações 20 a 28</b>	10	4,42	4,42
	10	4,30	4,30
	20	6,70	3,35
	20	6,54	3,27
	<b>Média</b>		<b>3,83</b>
<b>Amostra B: frações 18 a 21</b>	10	9,93	9,93
	10	10,93	10,93
	20	17,42	8,71
	20	17,72	8,86
	<b>Média</b>		<b>9,61</b>
<b>Amostra B: frações 22 a 28</b>	10	3,64	3,64
	10	3,91	3,91
	20	5,55	2,77
	20	5,67	2,83
	<b>Média</b>		<b>2,63</b>
<b>Amostra C: frações 18 a 20</b>	10	11,95	11,95
	10	12,59	12,59
	20	19,32	9,66
	20	20,10	10,05
	<b>Média</b>		<b>11,06</b>
<b>Amostra C: frações 21 a 28</b>	10	5,16	5,16
	10	4,91	4,91
	20	7,95	3,97
	20	7,81	3,91
	<b>Média</b>		<b>4,49</b>
<b>Amostra D: frações 18 e 19</b>	10	12,69	12,69
	10	12,42	12,42
	20	20,48	10,24
	20	22,02	11,01
	<b>Média</b>		<b>11,59</b>
<b>Amostra D: frações 20 a 28</b>	10	4,00	4,00
	10	3,85	3,85
	20	6,22	3,11
	20	6,32	3,16
	<b>Média</b>		<b>3,53</b>
<b>Amostra E: frações 18 a 20</b>	10	7,40	7,40
	10	7,41	7,41
	20	12,19	6,09

	20	11,75	5,88
	<b>Média</b>		<b>6,70</b>
<b>Amostra E: frações 21 a 28</b>	10	3,60	3,60
	10	3,76	3,76
	20	5,24	2,62
	20	5,71	2,86
	<b>Média</b>		<b>3,21</b>
<b>Amostra F: frações 18 e 19</b>	10	10,00	10,00
	10	10,11	10,11
	20	16,60	8,30
	20	16,25	8,12
	<b>Média</b>		<b>9,13</b>
<b>Amostra F: frações 20 a 28</b>	10	3,64	3,64
	10	3,98	3,98
	20	5,75	2,88
	20	5,80	2,90
	<b>Média</b>		<b>3,35</b>
<b>Amostra G: frações 18 e 19</b>	10	8,04	8,04
	10	7,65	7,65
	20	12,41	6,20
	20	12,90	6,45
	<b>Média</b>		<b>7,09</b>
<b>Amostra G: frações 20 a 28</b>	10	3,91	3,91
	10	4,42	4,42
	20	5,76	2,88
	20	6,22	3,11
	<b>Média</b>		<b>3,58</b>